

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISANDRA SANTOS FERREIRA MABA

Phyllosticta citricarpa: compatibilidade e *mating types* no ciclo sexual e aspectos da interação com o hospedeiro *Citrus sinensis*

CURITIBA

2014

LISANDRA SANTOS FERREIRA MABA

Phyllosticta citricarpa: compatibilidade e *mating types* no ciclo sexual,
interações com o hospedeiro *Citrus sinensis*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na
área de concentração em Genética, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná – UFPR.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Kava –
Departamento de Genética, UFPR.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke –
Departamento de Genética, UFPR

CURITIBA

2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

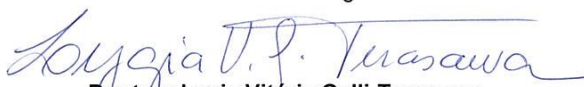
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **LISANDRA SANTOS FERREIRA-MABA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

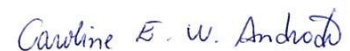
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de novembro de 2014


Doutor João Lúcio de Azevedo
Esalq/USP – Membro Titular



Doutor João Alencar Pamphile
Universidade Estadual de Maringá – Membro Titular


Doutora Lygia Vitoria Galli-Terasawa
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular


Doutora Caroline Elise Waculicz-Andrade
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular


Doutora Vanessa Kava-Cordeiro
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto


Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
Tel/(+41) 33611587 / 33611684 – Fax(+41) 33611793 – e-mail/ppg-gen@ufpr.br

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar iluminar meus caminhos quando as coisas parecem que vão dar em nenhum lugar.

Ao meu marido Pablo Maba que me acompanha e tem paciência comigo. Obrigada por todo o amor.

A minha família, pai, mãe, meus dois irmãos por sempre terem uma palavra de conforto, amor, amizade e apoio incondicional em momentos difíceis, também aos meus avôs tão queridos que sempre tiveram tanto orgulho e torcida por mim.

À profª Drª Vanessa Kava, minha orientadora querida, que me orienta desde a iniciação científica e me ajudou a crescer e amadurecer cientificamente. Meu muito obrigada.

À profª Drª Chirlei Glienke, minha co-orientadora que contribuiu e muito para a finalização deste trabalho, sempre com várias idéias para que o trabalho sempre se torne mais "publicável".

À profª Drª Lygia Vitória Galli Terasawa sempre tão querida, pela amizade, ensinamentos, atenção, mostrando que somente com respeito e ética seremos bons profissionais (e claro pelos deliciosos bolos da Marli).

Ao meu amigo Alan de Oliveira Silva por toda ajuda companheirismo, amizade sincera e por todos "eita xooofana" de cada dia.

Às amigas Angela Ikeda, Josiele Polzin e Vivian Zecchin pela grande amizade e carinho de sempre, mas principalmente pelos encontros terapêuticos.

Ao André Servienski um agradecimento especial, pois me ajudou imensamente nesse último ano, tendo que aprender a fazer tudo "pra ontem".

À amiga Juliana Marta M. Fischer pela amizade, muitas risadas e ajuda para sequenciarmos o "mundo" e sempre com "muito tempo" pra fazermos tudo.

À Camila da Costa Senkiv pela amizade e infinitos convites para sair.

À Renata Amorin e Marcella Cesar Silva pela amizade e convivência.

Ao Rodrigo Aluizio por todo o apoio técnico e por sempre pedir para parar de reclamar laboratório a fora.

À Ana Paula Chiaverini por cuidar dos nossos "bichinhos" e por sempre ajudar a quem precisa.

Ao Marcos Paulo Rosa que quase foi meu estagiário (mas não foi...) pela amizade e boas risadas.

À amiga Aliandra Graña de Medeiros pelos bolos caseeeeiros e carinho

Aos colegas de laboratório que me acompanharam ao longo de todos esses anos: Caroline Waculicz Andrade, Daiani Savi, Desirrê Petters, Douglas Adamoski, Eduardo Goulin, Fabiana Tonial, Francielly Gos, Hannah Ebbinghaus de Araujo, Kalinka Pereira Gonzales, Felipe b. Santos, Felipe Gomes, Lorena Pena, Yan Napoleão.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR pela disposição, apoio técnico e pelas facilidades concedidas.

A Prof^a Celia Regina Franco, do departamento de Biologia Celular da UFPR pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos professores do Departamento de Genética, por compartilharem conhecimento conosco.

Ao Departamento de Genética e ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR por darem suporte a minha formação acadêmica desde 2007.

Ao Prof Marcos Antonio Machado do Centro de Citricultura pelas facilidades concedidas e grande auxílio na finalização de parte deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma doença que causa lesões nas principais variedades de frutos cítricos e, em casos mais severos, causa sua queda prematura, levando a prejuízos de produção e perdas no mercado consumidor. É causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, cujos esporos são encontrados em folhas aderidas à planta e em lesões nos frutos na forma assexuada (picnidiósporos), e na forma sexuada (ascósporos) em folhas em decomposição no solo. Neste trabalho foram investigados os mecanismos que desencadeiam o ciclo sexual em diferentes isolados de *Phyllosticta citricarpa*, obtidos de diferentes regiões geográficas e de diferentes hospedeiros, buscando reconhecer sistemas de compatibilidade existentes. Testes de compatibilidade em variadas condições descritas na literatura e em outras condições propostas neste estudo foram realizados com 165 isolados de *Phyllosticta*. Algumas condições ensaiadas, previamente descritas na literatura, mostraram-se inadequadas para ensaios de compatibilidade entre diferentes isolados de *P. citricarpa*. Estruturas semelhantes a corpos de frutificação imaturos foram observadas na zona de encontro entre os isolados LGMF 76 e 114, porém não foram obtidos ascósporos. Na produção de ascósporos estão envolvidos os genes *mating type* (MAT) que regulam o desenvolvimento da reação sexual. Estes genes foram identificados após o desenho de *primers* específicos para esta espécie, com o objetivo de caracterizar este importante fitopatógeno quanto à dinâmica de recombinação possível em campo. Dos 148 isolados investigados, 21,62% apresentaram o gene MAT 1-1-1, 78,38% o gene MAT1-2-1. Considerando que os ascósporos, desempenham um papel importante no ciclo da Mancha Preta dos Citros, condições de produção e liberação destes esporos foram recriadas em laboratório com o desenvolvimento de caixas com temperatura, ventilação e umidade controlada, onde plantas axênicas desenvolvidas a partir do embrião de sementes de citros e livres de microrganismos foram utilizadas. Ainda, aspectos da colonização dos frutos pelo fitopatógeno foram investigados, avaliando-se a relação entre o crescimento, colonização de folhas e produção de picnídios frente aos principais terpenos produzidos na casca dos frutos cítricos e que comprovadamente exercem um papel no processo de atração de pragas e patógenos. Em todos os testes realizados foi possível detectar que os terpenos influenciam de diferentes formas o crescimento e a produção de picnídios de *P. citricarpa*. Este pode ser mais um passo no entendimento do mecanismo de interação entre planta-patógeno, podendo se tornar uma futura forma de controle dessa doença.

Palavras - chave: Mancha Preta dos Citros, *Phyllosticta citricarpa*, *mating type*, terpenos, interação planta-patógeno

ABSTRACT

The citrus black spot (CBS) is a disease that causes lesions on the main varieties of citrus fruits and, in more severe cases, causes its premature drop, leading to production and consumer market losses. It is caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*, whose spores are found over leaflets attached to the plant and in the lesions of fruits in the asexual form (pycnidiospores), and in the sexual form (ascospores) in decomposing leaflets in the soil. The present study investigated the mechanisms that trigger the sexual cycle in different isolates of *Phyllosticta citricarpa*, obtained from different geographic regions and different hosts, seeking to recognize existing compatibility systems. Compatibility tests on various conditions described in the literature and in other conditions proposed in this study were performed with 165 *Phyllosticta* isolates. Some conditions tested, previously described in the literature, have proved inadequate for testing compatibility between different isolates of *P. citricarpa*. Structures similar to immature fruiting bodies were observed in the area of contact between the isolates LGMF 76 and 114, however ascospores were not obtained. The production of ascospores involves the *mating type* (MAT) genes which regulate the development of sexual response. These genes were identified after drawing primers specific for this species, with the objective of characterizing this important phytopathogen regarding the dynamics of possible field recombination. Of the 148 isolates investigated, 21.62% presented the MAT 1-1-1 gene and 78.38% the MAT1-2-1 gene. Considering that the ascospores play an important role in the citrus black spot cycle, production conditions and release of these spores were recreated in the laboratory with the development of boxes with controlled temperature, ventilation and humidity, where axenic plants grown from the embryo of citrus seeds and free from microorganisms were utilized. Still, aspects of colonization of the fruit by the phytopathogen were investigated by evaluating the relationship among growth, leaf colonization and production of pycnidia front of the main terpenes produced in the peel of citrus fruits and proven to play a role in the process of attraction of pests and pathogens. In all tests conducted it was possible to detect that the terpenes influence in different ways the growth and production of *P. citricarpa* pycnidia. This can be another step in the understanding of the mechanism of interaction between plant-pathogen, and may become a future way of controlling this disease.

Key - words: citrus black spot, *Phyllosticta citricarpa*, *mating type*, terpenes, plant-pathogen interaction

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS LOCI MATING TYPE DE FUNGOS HETEROTÁLICOS E FUNGOS HOMOTÁLICOS.....	27
FIGURA 2 - CICLO DA MANCHA PRETA DOS CITROS EM CAMPO.....	30
FIGURA 3 - MODELO EXPERIMENTAL DE BURGESS (2009). A: REPRESENTA A DISPOSIÇÃO DOS ISOLADOS NA PLACA DE PETRI. B: COMBINAÇÕES POSSÍVEIS ENTRE OS ISOLADOS E CADA PLACA....	38
FIGURA 4 - MODELO DE PLACA DIVIDIDA EM QUATRO QUADRANTES MOSTRANDO DISCOS DE FOLHA DE CITROS, ONDE FORAM INOCULADOS OS ISOLADOS.....	39
FIGURA 5 - A: VISÃO MACROSCÓPICA DOS ISOLADOS EM PLACA SOBRE DISCO DE FOLHA. B: DETALHAMENTO DA REAÇÃO DE COMPATIBILIDADE ENTRE LGMF 76 E LGMF11.....	49
FIGURA 6 - ESTRUTURAS OBSERVADAS A PARTIR DA REAÇÃO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS ISOLADOS LGMF76 E LGMF114.....	50
FIGURA 7 - GRADIENTE DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO UTILIZANDO O ISOLADO LGMF76 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM O PAR DE PRIMER MAT 1-2-1 AVALIADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	52
FIGURA 8 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE MAT 1-2-1 EM LINHAGENS DE <i>P.citricarpa</i> EM GEL DE AGAROSE 1%.....	53
FIGURA 9 - ISOLADO DESTACADO MOSTRANDO DOIS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDOS COM O PAR DE PRIMER 17.....	54
FIGURA 10 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE MAT 1-1-1 EM LINHAGENS DE <i>P.citricarpa</i> EM GEL DE AGAROSE 1%.....	54

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - CICLO DA MANCHA PRETA DOS CITROS EM CAMPO.....	74
FIGURA 2 - PROJETO DA CAIXA PARA O EXPERIMENTO QUE SIMULA AS CONDIÇÕES DE CAMPO (A). (B) IMAGEM REAL.....	80
FIGURA 3 - FOTOS REAIS DAS CAIXAS. A e B: CONTROLE COM APENAS FOLHAS E PLÂNTULAS AXÊNICAS C e D: TRATAMENTO COM FRAGMENTOS DE CASCA DE LARANJA DOCE COM LESÃO E: TRATAMENTO COM FOLHAS SECAS DO CAMPO.....	81
FIGURA 4 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GCP EM GEL DE AGAROSE 1,5%.....	83

CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 16 DIAS DE EXPOSIÇÃO.....	101
FIGURA 2 - INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 16 DIAS DE EXPOSIÇÃO.....	103
FIGURA 3 - INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 21 DIAS DE CRESCIMENTO.....	104
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 21 DIAS DE CRESCIMENTO NO MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO.....	105
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>P.citricarpa</i> EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM OS TERPENOS CITRICOS após 21 DIAS DE CRESCIMENTO.....	106
FIGURA 6 - FRAGMENTOS DE FOLHA DO EXPERIMENTO 1 DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 28 DIAS DE INCUBAÇÃO	108
FIGURA 7 - FRAGMENTOS DE FOLHA DO EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DA <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM 21 DIAS DE INCUBAÇÃO, INCLUINDO-SE BETA-CARIOFILENO E LINALOL.....	110

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 - ISOLADOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DOS GENES MAT DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL, DIFERENTES HOSPEDEIROS E SUBSTRATOS.....	31
--	----

QUADRO 2 - <i>PRIMERS</i> DEGENERADOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO MAT 1-1-1 E MAT 1-2-1.....	43
---	----

QUADRO 3 - <i>PRIMERS</i> DESENHADOS PARA A DETECÇÃO DOS <i>loci</i> MAT EM <i>P.citricarpa</i>	45
---	----

CAPÍTULO 3

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES DAS AVALIAÇÕES SOBRE A INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>P.citricarpa</i>	97
--	----

QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DAS AVALIAÇÕES DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>P.citricarpa</i>	98
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE <i>P.citricarpa</i>	99
--	----

TABELA 2 - RESULTADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>P.citricarpa</i>	100
--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 3

GRÁFICO 1 - MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO DE <i>P.citricarpa</i> A TERPENOS VOLÁTEIS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.....	101
GRÁFICO 2 - MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO DE <i>P.citricarpa</i> A TERPENOS VOLÁTEIS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.....	102
GRÁFICO 3 - MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>P.citricarpa</i>	104
GRÁFICO 4 - MÉDIA DE CRESCIMENTO DE <i>P.citricarpa</i> , CRESCIDA EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM TODOS OS TERPENOS CITRICOS JÁ CITADOS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.....	105
GRÁFICO 5 - DETERMINAÇÃO DA % DE DISCOS DE FOLHAS COLONIZADAS POR <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM RELAÇÃO AO CONTROLE.	106
GRÁFICO 6 - DETERMINAÇÃO DA % DE DISCOS DE FOLHAS COLONIZADAS PELA <i>Phyllosticta citricarpa</i> COM RELAÇÃO AO CONTROLE EM 14 E 21 DIAS DE INCUBAÇÃO.....	108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO BIBLOGRÁFICA	15
3.1	MANCHA PRETA DOS CITROS E O FUNGO <i>Phyllosticta citricarpa</i>	15
3.2	GENES <i>MATING TYPE</i>	17
3.3	TERPENOS CÍTRICOS	19
CAPÍTULO 1 - <i>Phyllosticta citricarpa</i> : compatibilidade e identificação de genes <i>Mating types</i> em isolados de diferentes hospedeiros e origens geográficas....		22
1	INTRODUÇÃO.....	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1	COMPATIBILIDADE VEGETATIVA.....	38
2.1.1	Método 1 (BURGESS <i>et al.</i> 2009)	38
2.1.2	Método 2 (dois ou quatro isolados por placa).....	39
2.1.3	Método 3.....	40
2.1.4	Método 4.....	40
2.1.5	Método 5.....	40
2.1.6	Método 6 (O'GORMAN <i>et al.</i> , 2009).....	41
2.1.7	Método 7.....	41
2.2	IDENTIFICAÇÃO DOS <i>LOCI</i> de <i>mating types</i>	42
2.2.1	Triagem com <i>primers</i> degenerados para MAT 1-1-1 e MAT 1-2-1 (Santos <i>et al.</i> , 2010)	42
2.2.2	Desenho de <i>primers</i> específicos para MAT1-1-1 e amplificação por PCR.....	43
2.2.3	MAT1-2-1 desenho de <i>primers</i> específicos e amplificação por PCR.....	44
2.4	Sequenciamento e identificação do <i>locus</i> MAT	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1	TESTES DE COMPATIBILIDADE	45
3.2	ANÁLISES MOLECULARES	51
3.2	Desenhos de <i>primers</i> específicos <i>P. citricarpa</i> MAT1-1-1 e MAT1-2-1 .	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS.....		65
CAPÍTULO 2 - SIMULAÇÃO DE CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA A LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>		70
1	INTRODUÇÃO.....	72

1.1	MANCHA PRETA DOS CITROS (MPC)	72
1.2	O Gênero <i>Phyllosticta</i>	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85
	CAPITULO 3 - TERPENOS CÍTRICOS INFLUENCIAM O FUNGO <i>Phyllosticta citricarpa</i> , CAUSADOR DA MANCHA PRETA DOS CITROS.	91
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL BIOLÓGICO E METODOLOGIA	96
2.1	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	96
2.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
3.1	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	98
3.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	107
4	DISCUSSÃO	110
5	CONCLUSÃO	111
6	REFERÊNCIAS	113
	DISCUSSÃO GERAL	116
	CONCLUSÕES GERAIS	117
	REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

Desde 1960 a citricultura tem contribuído significativamente com o desenvolvimento do Brasil (NEVES *et al*, 2010). A produção comercial paulista de laranja na safra 2013/2014 foi prevista em 286,6 milhões de caixas, dos quais 215,3 milhões de caixas destinaram-se à indústria e 53,3 milhões para a comercialização *in natura*. Os dados fazem parte de levantamento realizado pelo Instituto de Economia Agrícola e pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, órgãos da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo, em parceria com a Companhia Nacional de Abastecimento do ministério de Agricultura (CONAB).

O Brasil lidera a produção mundial de laranjas. Segundo a Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos de uma safra total estimada em 308,8 milhões de caixas 40,8 kg, aproximadamente 258 milhões de caixas de laranja poderão ser processadas pela indústria na safra 2014/15.

Nos últimos anos, a citricultura tem sido afetada por várias doenças, dentre elas a Mancha Preta do Citros (MPC) causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. Relatos desta doença foram descritos em 1895 na Austrália, ocasionando elevadas perdas na produção e pós-colheita de plantas cítricas, especialmente laranja. Por volta de 1930, a enfermidade foi encontrada na região litorânea da província de Transvaal, na África do Sul, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos de pomares não protegidos (ROBBS, 1990). A MPC apresenta uma ampla distribuição geográfica, registrada na África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS; BITTENCOURT, 1995). Em abril de 2010, a preocupação de citricultores do estado da Flórida, nos Estados Unidos da América, aumentou com a chegada da MPC em seus pomares. Alguns pesquisadores verificaram que frutas da região estavam infectadas com a doença e expressaram preocupação com a falta de medidas eficientes para o controle da doença (BOUFFARD, 2010). Em decorrência dos prejuízos potenciais, essa doença é classificada como

quarentenária A1 para países da União Europeia, limitando significativamente a possibilidade de exportação de frutos *in natura* (SOUSA; GOES, 2010).

Segundo o Fundo de Defesa da Citricultura, FUNDECITRUS, as estratégias de manejo da Mancha Preta do Citros envolvem o uso de decompositores das folhas caídas, antecipação da colheita, irrigação preferencial durante o inverno, associados ao controle químico com o uso de fungicidas, entre outros. Embora as estratégias de manejo aumentem eficientemente o controle da doença, o método mais utilizado é o uso do controle químico com fungicidas. Problemas relacionados ao uso de fungicidas são frequentes, como o surgimento de isolados de *P. citricarpa* resistentes a fungicidas, como relatado com o uso de carbendazim (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Por estas e outras razões como a contaminação ambiental, elevação dos custos de produção e possibilidade de intoxicação de humanos e outros seres vivos, há um aumento no número de estudos com produtos que possam substituir os fungicidas. Alternativas para o controle desta doença são o alvo de pesquisa em vários países onde a cultura de citros tem grande importância econômica, como no Brasil. Alguns estudos visam entender a relação entre o patógeno e seu hospedeiro, buscando, desta forma, alternativas para o controle da doença. Estudos recentes têm indicado que alterações na composição dos terpenos presentes na casca de citros tem afetado o desenvolvimento de *P. citricarpa* sobre o fruto (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2012), sendo necessário a avaliação individual desses compostos para determinar sua efetividade.

O gênero *Phyllosticta* foi descrito em 1982, por Viala e Ravaz, e compreende as formas teleomórficas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984).

O fungo *Phyllosticta citricarpa* é um fitopatógeno presente em diversos países. Apresenta-se sob duas formas de reprodução: os ascósporos (esporos sexuais) e picnidísporos (esporos assexuais). Os ascósporos depositam-se em folhas caídas e em decomposição no solo e são carregados pelo vento enquanto

os picnidiósporos se dispersam com a água aumentando o desenvolvimento da MPC nas plantas (SPÓSITO, 2003; SPÓSITO *et al.* 2007).

Os fungos ilustram uma gama completa de tipos de reações sexuais. Algumas espécies exibindo cruzamentos entre sexos opostos (heterotalismo), enquanto outras apresentam autofecundação (homotalismo), ou ainda a presença de múltiplos sexos. Muitas dessas informações foram obtidas em estudos com isolados do gênero *Aspergillus* (KRONSTAD, 2007). Para que se possa estudar geneticamente um fungo, deve-se buscar reconhecer os mecanismos possíveis pela recombinação, reação sexual, quando esta ocorre, e formas alternativas como o ciclo parassexual e a paramiose (DALZOTO, *et al.*, 2006).

Rego e Oliveira (2007) caracterizaram a podridão negra da videira causada por *Phyllosticta ampellicida* (teleomorfo *Guignardia bidwellii*) descrevendo o possível ciclo da doença em Portugal.

Neste trabalho foram investigados os mecanismos que desencadeiam a reação sexual entre diferentes isolados de *Phyllosticta citricarpa*, obtidos de diferentes regiões geográficas e de diferentes hospedeiros, buscando reconhecer sistemas de compatibilidade existentes. Genes envolvidos na reação sexual (*mating types*) foram identificados após o desenho de *primers* específicos para esta espécie, com o objetivo de caracterizar este fitopatógeno quanto à dinâmica de recombinação possível em campo. Considerando que os esporos da fase sexuada, os ascósporos, desempenham um papel importante no ciclo da Mancha Preta dos Citros, condições de produção e liberação destes esporos foram recriadas em laboratório com o desenvolvimento de caixas com temperatura, ventilação e umidade controlada, onde plantas axênicas, produzidas por cultura de embrião de sementes de laranja e livres de microrganismos foram utilizadas. Ainda, aspectos da colonização dos frutos pelo fitopatógeno foram investigados, avaliando-se a relação entre o crescimento, colonização de folhas e produção de picnídios frente aos principais terpenos produzidos na casca dos frutos cítricos e que comprovadamente exercem um papel no processo de atração de pragas e patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o nível de conhecimento do fungo *Phyllosticta citricarpa* e a interação com hospedeiros cítricos, pelo estudo do seu tipo de reação sexual que o fungo *P. citricarpa* realiza e averiguar sua interação com hospedeiros cítricos buscando relação com outros processos relacionados com o ciclo da doença Mancha Preta dos Citros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência do ciclo sexual nesta espécie:
 - Avaliar a compatibilidade genética entre isolados de *P. citricarpa* de diferentes hospedeiros e origens geográficas.
 - Identificar a presença de genes relacionados ao tipo de reação sexual (*mating types*).

- Caracterizar aspectos da interação entre o fitopatógeno *P. citricarpa* e seu hospedeiro com maior importância comercial *Citrus sinensis*:
 - Recriar em laboratório as condições descritas na literatura para a produção e liberação de ascósporos.
 - Avaliar a relação entre o crescimento, colonização de folhas e produção de picnídios de *P. citricarpa* com a exposição aos principais terpenos produzidos na casca dos frutos cítricos.

3 REVISÃO BIBLOGRÁFICA

3.1 *Phyllosticta citricarpa* e a MANCHA PRETA DOS CITROS

Dentre as principais doenças da citricultura, destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa, fase anamórfica. A fase teleomórfica foi descoberta por Kiely, em 1948, sendo chamada de *Guignardia citricarpa* Kiely (KOTZÉ, 1981) até o final de 2012. Uma mudança importante ocorreu em 2011 com a Declaração de Amsterdam (HAWKSWORTH *et al.*, 2011), onde os fungos deixaram de ter dois nomes correspondentes às fases sexuada e assexuada, para ter apenas uma denominação, que passou a valer a partir de janeiro de 2013.

Neste caso o fungo alvo deste trabalho, *Guignardia citricarpa* que passou a ser designado como *Phyllosticta citricarpa*. Revisões da taxonomia deste grupo foram realizadas (Liu *et al.*, 2012) e combinando-se análises morfológicas e multigênicas (WIKKEE *et al.*, 2013) foi proposto um novo agrupamento para estes fungos, com a criação da Família Phyllostictaceae, a qual *Phyllosticta citricarpa* agora pertence. Assim a classificação é a seguinte: Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes, Ordem Botryosphaerales, Família Phyllostictaceae.

McOnie (1964) mostrou formas de *Phyllosticta*, que ocorriam em citros, uma patogênica e outra endofítica. Baayen *et al.* (2002) descreveram que a forma endofítica correspondia a uma espécie denominada *P. capitalensis* (teleoformo: *Guignardia mangiferae*). Glienke *et al.* (2011) mostraram que a espécie *G. mangiferae* é uma outra espécie e não o teleomorfo de *P. capitalensis*.

A MPC é responsável por grandes perdas em várias regiões produtoras de citros do mundo. Segundo Rosseto *et al.* (2011), além de questões econômicas, produtores enfrentam sérios problemas fitossanitários na citricultura, que tem acometido os pomares brasileiros, principalmente do Estado de São Paulo, onde a ocorrência de doenças é favorecida pela presença de tecidos foliares e clima adequado, o que permite a continuidade do ciclo da Mancha Preta dos Citros. Todas as principais variedades comerciais presentes

nos pomares paulistas são suscetíveis, excluindo-se a laranjeira azeda (*Citrus aurantium*. L.) e a limeira ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Osbeck) (Kotzé, 1981). Nos pomares onde há laranjeiras doces, os sintomas são mais severos (FEICHTENBERGER, 1996).

Essa doença foi descrita inicialmente em pomares da Austrália. Atualmente é encontrada em locais da África, Oceania, América do Sul e recentemente nos Estados Unidos. Segundo Goes (1998) a MPC foi encontrada na década de 40, mas permaneceu silenciosa um grande período de tempo, pois milhões de árvores foram eliminadas devido à epidemia da tristeza dos citros na década de 30.

A Mancha Preta dos Citros pode ter início tanto com os picnidiósporos (conídios) presentes em picnídios formados nas lesões existentes nos frutos maduros, ramos e folhas caídas no solo, assim como nos ascósporos, formados em folhas em decomposição caídas no solo sob as plantas cítricas (LARANJEIRA *et al.*, 2005; GOES, 1998). Segundo McOnie (1964) a doença pode ter um estágio de latência e o aparecimento de sintomas pode levar bastante tempo, dependendo das condições ambientais e da variedade da planta. Frutos com a doença, apesar do fungo colonizar apenas a casca, tem sua comercialização bastante prejudicada, por ser considerada uma praga quarentenária A1 pela União Europeia, maior mercado importador da laranja brasileira (SCALOPPI, 2006).

A integração das diferentes estratégias de manejo deve ser realizada para obtenção de sucesso no controle da doença. O manejo do mato da entrelinha sob a copa das plantas apresenta retornos diretos (ROSSÊTTO, 2009). A cobertura morta sob a copa da planta cítrica, além servir como barreira física para os ascósporos, contribui para reduzir a amplitude térmica no solo e acelerar a decomposição das folhas (BELLOTE *et al.*, 2013).

Bellotte *et al.* (2013) verificaram que o manejo dos cultivos como amendoim-forrageiro cv. Amarillis e da gramínea *coastcros*, lançados sob as plantas cítricas, reduziram a severidade da MPC a níveis comparáveis ao controle químico padrão da doença.

O controle da MPC está baseado na utilização de fungicidas. No Brasil, a MPC vem sendo controlada, principalmente, através do controle químico sistemático e inúmeras pulverizações com fungicidas específicos são realizadas (4-5 aplicações/ano). Por isso, fica evidente a necessidade de se obter novas alternativas de controle que possam colaborar com o sistema de produção atual (ROSSETO, 2010).

A MPC geralmente é controlada por 4 a 5 pulverizações de fungicida por ano no campo o que aumenta o custo de produção da cultura. Assim o estudo da doença em si é importante, para gerar outras possibilidades de combate, como a transformação genética. Para isso, é necessário o conhecimento de quais são as defesas da planta contra o patógeno, pensando na escolha de um gene específico que poderá ser utilizado em transformações futuras contra essa doença (BRIGATI, 2009).

Assim, levando em consideração o prejuízo econômico que a MPC causa e sabendo-se das diferenças de suscetibilidade entre as espécies e variedades cítricas, é de grande importância a caracterização da relação da *Phyllosticta citricarpa* com as diferentes variedades de citros.

3.2 GENES *MATING TYPE*

Reprodução sexual é um fenômeno comum entre organismos eucarióticos. Fungos que realizam reprodução sexual, geralmente possuem maiores habilidades em se adaptar a mudanças no ambiente, comparado a populações que se reproduzem assexualmente (HEITMAN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010).

Genes *mating type* (MAT), codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição que regulam a reprodução sexual em fungos (HEITMAN *et al.*, 2013). Na maioria dos Ascomycetos, os genes MAT estão representados por dois idiomorfos conhecidos como MAT 1-1 e MAT 1-2 (TURGEON e YODER, 2000). Os idiomorfos de espécies heterotáticas da classe Dothideomycetes foram caracterizados pela presença de um único gene. Isolados MAT1-1 contém um

único gene que codifica uma proteína com um domínio alfa (MAT1-1-1) e os isolados MAT1-2 codificam uma proteína contendo um grupo de alta mobilidade (HMG) domínio (MAT1-2-1) (TURGEON e YODER, 2000; ARZANLOU *et al.*, 2010). Em espécies fúngicas auto-compatíveis os indivíduos têm tanto MAT1-1 e MAT1-2. Membros homotáticos dos Dothideomycetes podem levar ambos os genes MAT em seu genoma haplóide (YUN *et al.*, 1999; BIHON *et al.*, 2014).

Fungos ilustram uma gama de tipos de reações sexuais. Algumas espécies exibem cruzamentos entre sexos opostos (heterotalismo), enquanto outros apresentam homotalismo, ciclo parassexual. Muitas dessas informações foram obtidas em estudos com isolados do gênero *Aspergillus* (KRONSTAD, 2007). Ainda segundo Kronstad (2007), a organização dos genes de *mating type* tem sido muito estudada entre os ascomicetos nos últimos 20 anos. Ascomicetos são caracterizados pela formação do ascósporo dentro de uma estrutura formando o asco e são agrupados em classes, de acordo com o desenvolvimento dos corpos de frutificação, a estrutura da parede do asco e a forma de liberação dos ascósporos.

Grande parte das espécies de ascomicetos heterotáticas possuem *mating type* com dois alelos alternativos (GLASS *et al.*, 1988; HISCOCK, 1999; METZENBERG *et al.*, 1990). Em contraste com o sistema de acasalamento em ascomicetos, basidiomicetos evoluíram um tipo de acasalamento múltiplo (KOTHE, 2001). A maioria dos basidiomicetos possui múltiplos *mating types* determinados por um, dois ou três diferentes *loci* genéticos cada qual podendo ter duas ou mais formas diferentes (RAPPER 1966; HISCOCK, 1999).

Para *Aspergillus nidulans*, já foram descritos os cruzamentos entre os tipos distintos de linhagens haplóides, autofecundação e comportamento parassexual que resulta na formação de diplóides ou heterocários (cepas com dois núcleos geneticamente distintos). Análises no genoma de *A. nidulans* (GALAGAN *et al.*, 2005; PAOLETTI *et al.*, 2007), revelaram que o genoma contém ambas as sequências de codificação de proteínas reguladoras do MAT conhecidas para controlar o reconhecimento de parceiro no cruzamento de espécies de fungos filamentosos (SHIU e GLASS, 2000). Em *Neurospora crassa* e em outras espécies de fecundação cruzada, cada parceiro

do cruzamento carrega distintas sequências MAT que codificam tanto a proteína “ α ” ou “a” e estas proteínas especificam a identidade sexual e controlam os eventos de cruzamentos que levam à fusão.

Os loci MAT do gênero *Diaporthe* e seu anamorfo *Phomopsis* diferem em apenas um gene. Para diagnosticar *mating types* em *Diaporthe* e *Phomopsis*, avaliar a sua utilidade na indução da fase sexuada *in vitro* e delimitar espécies biológicas, Santos *et al.* (2009), desenharam *primers* que amplificam parte dos genes MAT 1-2-1 MAT1-1-1.

Paoletti *et al.* (2007), também demonstraram que as sequências MAT são funcionalmente necessárias para a fertilidade, pois a supressão dos genes MAT resultou em ausência de ascósporos.

A possibilidade dos fungos de realizarem “cruzamentos” em laboratório é uma ótima ferramenta para a análise genética e abre possibilidades para o melhoramento genético.

3.3 TERPENOS CÍTRICOS

Entre a grande variedade de compostos químicos produzidos pelas plantas, alguns são liberados para o ambiente. Além do CO₂, O₂, vapor de água e hormônios como etileno gasoso, as plantas emitem uma variedade de compostos orgânicos, tais como os compostos orgânicos voláteis (COVs), que são liberados principalmente de órgãos florais, mas também das partes vegetativas, especialmente após danos (UNSICKER *et al.*, 2009).

Compostos orgânicos voláteis desempenham vários papéis nas interações de plantas com o ambiente (IRMISCH, *et al.*, 2014). Compostos florais e de frutos, por exemplo, são conhecidos como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, respectivamente, enquanto que outros compostos são descritos como tendo várias funções como na comunicação inter e intra-planta, planta-defesa contra herbívoros e patógenos (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007; UNSICKER *et al.*, 2009). A emissão destes compostos por órgãos vegetativos de plantas é induzida frequentemente por estresses bióticos como

herbivoria de insetos (DICKE e VAN LOON, 2000; DICKE e BALDWIN, 2010). Algumas misturas destes voláteis podem atrair inimigos naturais de herbívoros, uma reação denominada defesa indireta (UNSICKER *et al.*, 2009). No geral, misturas voláteis são compostas por terpenos, mas também podem compreender outras classes de compostos naturais, incluindo voláteis encontrados em folhas verdes, álcoois, ésteres, e os voláteis contendo azoto. Terpenos representam o maior e mais diversificado grupo de metabólitos secundários de plantas, sendo mais frequentes os monoterpenos e os sesquiterpenos (UNSICKER *et al.*, 2009; IRMISCH *et al.*, 2014).

Estudos recentes têm indicado que alterações na composição de terpenos voláteis presentes na casca de citros afetam o desenvolvimento de patógenos no fruto assim como a relação da planta com insetos praga (RODRIGUEZ *et al.*, 2011; KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2012), sendo necessário a estudos mais aprofundados como a avaliação individual dos principais compostos para determinar sua efetividade.

Experimentos realizados utilizando laranjas geneticamente modificadas (*Citrus sinensis*) com alteração (*down-regulation*) no gene CitMTSE1 (limoneno sintetase), e consequente diminuição da produção de limoneno, o terpeno mais abundante em laranja doce, mostraram que a ação de algumas espécies de fungos fitopatogênicos e a atração de insetos foi diminuída. Estes experimentos comprovam que os terpenos presentes nos óleos essenciais de citros estão relacionados com diversas funções como a relação com patógenos, atração de animais para dispersão das sementes e atração de polinizadores (RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Ainda segundo Rodriguez *et al.* (2011) a modificação no gene CitMTSE1 que causa uma diminuição da produção de limoneno, ocasiona como efeito colateral um aumento da produção de nerol e citronelol. Esse aumento se deve à síntese de terpenos originados a partir de um composto em comum, logo a inibição da produção de um desses voláteis, leva a uma maior disponibilidade deste composto precursor e acarreta em um aumento das outras vias de produção de terpenos.

Limoneno é um monoterpreno, líquido incolor e volátil, encontrado naturalmente nas cascas de frutas cítricas, sendo responsável pelo seu odor característico. Possui a fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, relativamente estável (AZAMBUJA, 2013).

Nerol é um álcool do tipo monoterpreno, classe de substâncias naturais, ou metabólitos secundários de origem vegetal, especialmente das coníferas, de fórmula química geral $(C_5H_8)_n$. Encontrado em muitos óleos essenciais, como da erva-cidreira. Ele foi originalmente isolado do Óleo de néroli, de onde provém seu nome. É um líquido incolor que possui aroma de rosa doce, sendo largamente usado na perfumaria (FAHLBUSCH, 2003).

Citronelol é monoterpreno acíclico natural um dos componentes do óleo essencial de algumas plantas medicinais utilizadas na medicina popular, como o *Cymbopogon citratus* e a *Lippia alba*, sendo pertencente a uma família de produtos naturais provenientes de unidades de isopreno C_5 . Alguns efeitos farmacológicos tais como atividades antibacteriana, antifúngica, anti-espasmódico e anticonvulsivante já foram descritos para citronelol (BASTOS *et al.*, 2009).

Beta-cariofileno é um constituinte importante em várias espécies de óleos essenciais de plantas medicinais usadas na medicina popular do Brasil, pertence à classe química dos sesquiterpenos e tem sido submetido a vários estudos. Pode ser empregado na medicina tradicional como medicamento com ação antiinflamatória, antitumoral, bactericida, insetífugo espasmolítico (CARNEIRO *et al.*, 2010)

Linalol é um monoterpreno alcoólico terciário de cadeia aberta. Pode ser encontrado normalmente sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira ligação dupla. Possui um átomo de carbono assimétrico e, por isso, podem existir enantiômeros. Tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes e testado como acaricida, bactericida e fungicida. Na medicina tem sido aplicado, com sucesso como sedativo (SILVA *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 1

***Phyllosticta citricarpa*: compatibilidade e identificação de genes *Mating types* em isolados de diferentes hospedeiros e origens geográficas.**

(*Phyllosticta citricarpa*: compatibility and mating type identification and distribution in strains from different hosts and geographical origins.)

Ferreira-Maba; L.S.¹, Glienke; C¹, Goulin; E.H¹, Serviensi; A.¹, Amorin, R¹;
Aluizio; R¹, Galli-Terasawa; L.V.¹, Machado, M. A.; Kava-Cordeiro; V.¹

¹LabGeM, Laboratório de Genética de Microrganismos; Departamento de Genética, UFPR.

lisandragenetica@gmail.com

RESUMO

O estudo de mecanismos de recombinação de fungos fitopatogênicos, especialmente relacionados ao ciclo sexual, tornou-se importante, pois em algumas casos este faz parte do processo de diversificação da patogenicidade. Neste contexto, enquadra-se o fungo *Phyllosticta citricarpa*, causador da Mancha Preta dos Citros. Apesar da importância da reação sexual no aumento da variabilidade nos fungos, ainda não havia sido detectada essa característica em *P.citricarpa*. Neste estudo são descritas diversas condições de testes de compatibilidade para a indução de produção de ascósporos de *P. citricarpa*, em laboratório. Foram utilizados 165 isolados de nove hospedeiros diferentes e nove origens geográficas no Brasil e entre dois isolados possíveis corpos de frutificação imaturos foram obtidos e em todas as condições ensaiadas, não foram obtidos ascósporos. A identificação de genes *mating type* nesta espécie torna possível o entendimento da biologia deste importante fitopatógeno, indicando se a espécie é heterotática ou homotática, bem como para uma melhor compreensão do ciclo da doença Mancha Preta dos Citros. Para isso foram desenhados neste trabalho *primers* específicos para MAT 1-1-1 e MAT1-2-1 de *P. citricarpa* a partir do rascunho do genoma deste fungo. Dos 148 isolados investigados, 21,62% apresentaram o gene MAT 1-1-1, 78,38% o gene MAT1-2-1. A proporção observada, diferente de 1:1, pode indicar que a reação sexual não acontece de forma contínua. Não foi observada correlação entre o hospedeiro ou a origem geográfica e o tipo de gene *mating type* identificado. Embora a reação sexual completa não tenha sido observada, os resultados obtidos pelo padrão dos genes de *mating type* sugerem que *P.citricarpa* é heterotática. Porém uma confirmação será necessária, especialmente com a identificação dos produtos destes genes, comprovando que ambos estão íntegros e são funcionais.

Palavras chave: Heterotalismo, homotalismo, reação sexual, ascomicetos, mecanismos de recombinação.

ABSTRACT

The study of recombination mechanisms in pathogenic fungi, especially related to sexual cycle, has become important because in some cases this is part of the pathogenic diversification process. In this context, there is the fungus *Phyllosticta citricarpa*, causing the Citrus Black Spot disease. Despite the importance of sex to increase variability in fungi, this trait had not been detected in *P.citricarpa* yet. In this study, several conditions of compatibility tests for ascospore production induction on *P. citricarpa* in the laboratory are described. One hundred and sixty-five (165) isolates were used from nine different hosts and nine different geographical origins in Brazil and between two isolates, possible immature fruiting bodies were obtained and in all conditions tested, no ascospore was obtained. The identification of Mating Type Genes in this species makes it possible to understand the biology of this important phytopathogen, indicating whether the species is *heterothallic* or *homothallic* as well as a better understanding of the Citrus Black Spot disease cycle. The specific primers MAT 1-1-1 MAT1-2-1 of *P. citricarpa* were designed based on the *draft genome* sequence of the *fungus*. One hundred and forty-eight (148) isolates were investigated and 21.62% had the MAT gene 1-1-1 and 78.38% had the MAT1-2-1 gene. The observed ratio, different from 1:1 may indicate that the sexual response does not occur continuously. No correlation was observed between the host or the geographical origin and the type of Mating Type Gene identified. Although full sexual reaction has not been observed, the results of the pattern of Mating Type Genes suggest that *P.citricarpa* is *heterothallic*. However, a confirmation is necessary, especially about the identification of these genes products, showing that both are reliable and functional.

Key words: heterothallism, homothallism, sexual reaction, ascomycetes, recombination mechanisms.

1 INTRODUÇÃO

Reprodução sexual é um fenômeno comum entre organismos eucarióticos. Fungos que realizam reprodução sexual geralmente possuem maior habilidade em se adaptar a mudanças no ambiente, como exemplo é possível citar a facilidade em remover mutações que ameacem a estabilidade do genoma, e ainda são mais eficientes em selecionar mutações benéficas, quando comparado a populações que se reproduzem assexuadamente (HEITMAN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010). De fato, a reprodução sexuada parece ser essencial, para diversas funções não relacionadas apenas com a recombinação de vários organismos (GOUYON *et al.*, 1999; LÓPEZ-VILLAVICENCIO *et al.*, 2013). Apesar de vários estudos para esclarecer o porquê da reprodução sexual ser prevalente entre os eucariontes mesmo com alto custo energético, a manutenção do sexo permanece como uma das questões fundamentais na biologia evolutiva (LÓPEZ-VILLAVICENCIO *et al.*, 2013).

O mecanismo envolvido no processo de reprodução sexual está muitas vezes associado ao desenvolvimento de estruturas de resistência ou de dispersão, especialmente em plantas e fungos, como é o caso dos esporos sexuais de *Phyllosticta citricarpa*. Os ascósporos são encontrados em folhas caídas em decomposição e possuem uma morfologia que facilita seu transporte pelo vento, caracterizando dispersão de longo alcance (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981, 1996; SPÓSITO *et al.*, 2007).

Como o sexo tem uma ligação robusta com muitas funções importantes, a perda da reprodução sexual teria consequências associadas à perda de resistência ou de estruturas de dispersão (VIENNE *et al.*, 2013). Assim como para outras funções importantes, como o controle de elementos transponíveis e a eliminação de vírus (AANEN e HOEKSTRA, 2007; DIEPENINGEN *et al.*, 2008; VIENNE *et al.*, 2013). Vienne *et al.* (2013) ainda relacionam, a atual predominância de espécies que mantém a reprodução sexual com a manutenção das estruturas de sobrevivência. Assim, as espécies que existem atualmente são essencialmente aquelas que não puderam abrir mão de suprimir a reprodução sexual. Todas as espécies que seriam capazes de evitar esse

mecanismo posteriormente desapareceriam, porque evoluíram muito lentamente.

Fungos possuem uma gama complexa de tipos sexuais, com algumas espécies exibindo cruzamentos entre tipos sexuais opostos, denominado de heterotalismo, enquanto outros apresentam homotalismo, ou seja, o ciclo sexual ocorre entre linhagens com o mesmo tipo sexual ou ainda na mesma linhagem. Muitas dessas informações foram obtidas em estudos com isolados do gênero *Aspergillus* (KRONSTAD, 2007). Este arranjo pode ter evoluído sob seleção para compatibilidade universal (BILLIARD *et al.*, 2012). Perguntas sobre qual modo de reprodução sexual, heterotalismo ou homotalismo, é ancestral e qual mecanismo genético evolutivo intermedeia a mudança de um para o outro têm recebido muita atenção dos biólogos (DEBUCHY *et al.*, 2010).

A organização do *mating type* tem sido estudada em ascomicetos nos últimos 20 anos. Estes são caracterizados pela formação do ascósporo dentro de uma estrutura formando o asco e são agrupados em classes, de acordo com o desenvolvimento dos corpos de frutificação, a estrutura da parede do asco e a forma de liberação dos ascósporos (KRONSTAD, 2007). Portanto, a compreensão da organização MAT *locus* pode fornecer informações sobre a genética e evolução do grupo dos ascomycetos. Paoletti *et al.* (2007), demonstraram que as sequências MAT são funcionalmente necessárias para a fertilidade, pois a supressão dos genes MAT resultou em ausência de ascósporos.

Genes MAT têm sido úteis para avaliar as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos (DEBUCHY e TURGEON 2006; DEVIER *et al.*, 2009). Genealogias baseadas nos genes de MAT foram concordantes com relações já estabelecidas base em RNAr e outros genes (LIM *et al.*, 2004). Além disso, análises filogenéticas de SLA2 (controle de montagem do citoesqueleto) e APN1 (DNA Lyase) (genes que flanqueiam os genes MAT), demonstraram que as sequências de opostos *mating types* corroboram filogenias anteriormente determinadas (RYDHOLM *et al.*, 2007; ARZANLOU *et al.*, 2010; TSUI *et al.*, 2013).

Foi visto que os membros homotáticos de *Dothideomycetes* podem levar ambos os genes em seu genoma haplóide. Idiomorfos de espécies heterotáticas da classe *Dothideomycetes* foram caracterizados pela presença de um alfa domínio em MAT1-1 ou um grupo de alta mobilidade (HMG) em MAT1-2 (COPPIN *et al.*, 1997; TURGEON; YODER, 2000; DEBUCHY *et al.*, 2010; HEITMAN, *et al.*, 2013).

MAT1-1-1 e MAT1-2-1 são fatores de transcrição que regulam a reprodução sexual em fungos. E que possuem domínios de ligação conservados de DNA que estão envolvidos na regulação da identidade de parâmetros para o desenvolvimento da reação sexual (COPPIN *et al.* 1997; WIRSEL *et al.*, 1998; YUN *et al.*, 1999; TURGEON; YODER, 2000; NOLTING e POGGELER, 2006; ARZANLOU *et al.*, 2010). Em fungos pertencentes ao subfiló Pezizomycotina (FIGURA 1), o desenvolvimento sexual é controlado por um único *locus* (MAT), em que os genes determinam se há compatibilidade e regulam os processos-chave para os cruzamentos (METZENBERG, 1990; COPPIN *et al.*, 1997; DEBUCHY *et al.*, 2010). Em *Neurospora crassa* (FIGURA 1) e em outras espécies de fecundação cruzada, cada parceiro do cruzamento carrega distintas sequências MAT que codificam tanto a proteína “alfa” ou “a” e estas proteínas especificam a identidade sexual e controlam os eventos de cruzamentos (GLASS *et al.*, 1990).

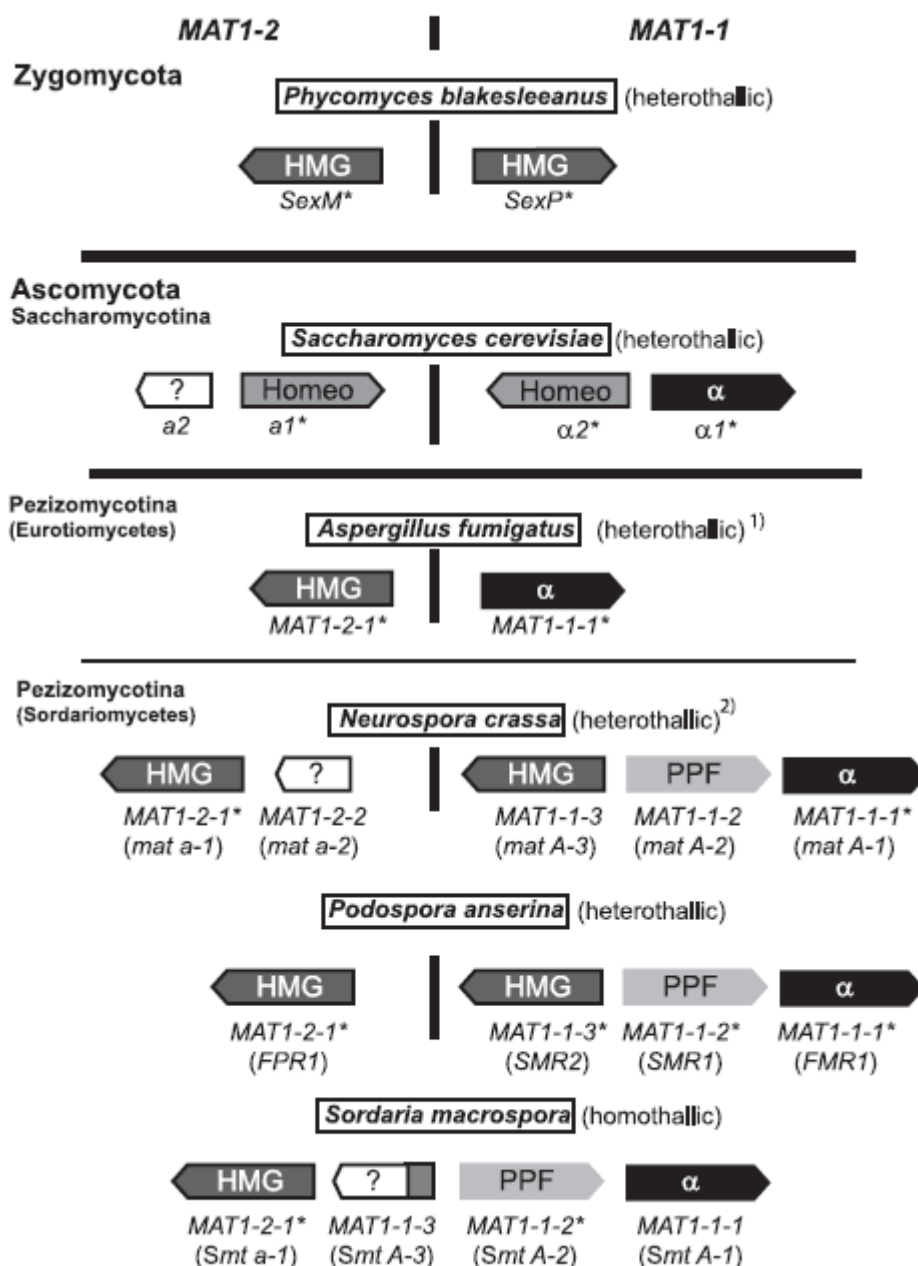


FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS LOCI MATING TYPE DE FUNGOS HETEROTÁLICOS E FUNGOS HOMOTÁLICOS.

FONTE: Klix *et al.*, (2010).

Nota: as setas indicam a orientação e tamanho das ORFs dos *mating types*. Os genes que possuem o mesmo domínio funcional têm a mesma cor. Os genes essenciais para o desenvolvimento sexual estão marcados com asterisco.

Os loci MAT de *Diaporthe* e seu anamorfo *Phomopsis* diferem em apenas um gene. Para diagnosticar *mating types* em *Diaporthe* e *Phomopsis*, avaliar a sua utilidade na indução teleomorfo *in vitro* e delimitação de espécies biológicas,

Santos *et al.* (2010), desenharam *primers* que amplificam parte do gene MAT 1-2-1 e MAT1-1-1.

Alguns fungos ascomicetos esporulam tanto sexual quanto assexuadamente. No entanto, esporos sexuais (ascósporos) são envolvidos dentro de um asco o qual pode conter quatro ou oito ascósporos dependendo da espécie. Em Pezizomycotina, o asco está em um ascocarpo, que é classificada em diferentes estruturas conhecidas como um cleistotécio (ascocarpo fechado encontrado em *Aspergillus nidulans*), peritécio (semelhante a uma garrafa encontrado em *Neurospora* spp.), apotécio (estrutura aberta em forma de taça) e pseudotécio. Este tipo é semelhante a um peritécio, mas os ascos não são regularmente organizados. A estrutura possui uma parede dupla que se expande quando absorve água e expulsa os esporos promovendo a sua dispersão. Entre os fungos com esse tipo de estrutura estão espécie do gênero *Phyllosticta* e *Venturia inequalis*. Ao contrário dos euascomycetes, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida* spp. não apresentam um ascocarpo (LEE *et al.*, 2010).

Böhm *et al.* (2013) descreveram somente recentemente a reação sexual de um dos fungos mais importantes para a biotecnologia, *Penicillium chrysogenum*, que vem sendo estudado há quase 80 anos, isto demonstra a grande dificuldade de indução da fase sexual em condições de laboratório para algumas espécies. Neste estudo, foram testados diferentes meios de cultura, como os descritos como indutores da reação sexual em *Aspergillus fumigatus* (O'GORMAN *et al.*, 2009). Nas condições testadas, mesmo com o tempo de cinco semanas a três meses de cultura pareada, o cleistotécio não se formou em todos os cruzamentos que apresentavam zona de contato entre parceiros opostos de *mating type*. Os dados deste estudo mostram que os resultados obtidos para *P. chrysogenum* são de um significado mais amplo porque indicam que a recombinação sexual também pode ser viável para outros fungos filamentosos de importância econômica que se presumem apresentar exclusivamente reprodução assexuada. A descoberta recente da reação sexual deste fungo de grande importância econômica mostra a dificuldade de se obter a reprodução sexual *in vitro*, mesmo com um fungo extremamente estudado como *Penicillium* (BÖHM *et al.*, 2013). Esta descoberta há algumas décadas,

teria aberto novas possibilidades de obtenção de linhagens altamente produtoras de penicilina por recombinação.

Outra questão interessante é se existe uma associação entre o tipo de *mating type* e virulência. Um estudo recente mostrou uma frequência de quatro vezes maior de MAT1-1 de genótipos MAT1-2 em isolados de *Aspergillus fumigatus* (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2009). Assim, mais investigações sobre a possível ligação entre o tipo de *mating type* e outras características são importantes.

O gênero *Aspergillus*, que inclui tanto espécies sem reação sexual conhecida e outras com esta reação já observada, fornece dados robustos para estudar a evolução da reprodução sexuada em fungos. O fato de *A. fumigatus* e *A. parasiticus* ainda manter reações sexuais pode nos fornecer dados para a compreensão sobre o potencial da reprodução sexual comparada à assexuada. Estes resultados também facilitam a investigação sobre a base genética da patogenicidade e resistência a fungicidas de *A. fumigatus* e *A. parasiticus* com o objetivo de melhorar os métodos de controle de doenças como aspergilose e contaminação por micotoxinas (LEE *et al.*, 2010).

Rego e Oliveira (2007) elucidaram a podridão negra da videira causada por *Phyllosticta ampellicida* (teleomorfo *Guignardia bidwellii*) descrevendo o possível ciclo da doença em Portugal e considerando a importância de se analisar aspectos como o desenvolvimento dos ascósporos, para a obtenção de dados que facilitam um diagnóstico mais rápido da doença.

A reação sexual de *Phyllosticta citricarpa*, causador da Mancha Preta dos Citros (MPC), considerada a pior doença fúngica em citros na atualidade, tem papel fundamental nos processos de infecção e colonização deste fungo (FIGURA 2). Portanto, é importante o entendimento deste ciclo, pois este conhecimento poderá levar à definição dos melhores caminhos para o controle desta doença e ainda como o fungo interage com a planta, considerando que a

participação dos ascósporos é importante para o ciclo da MPC.

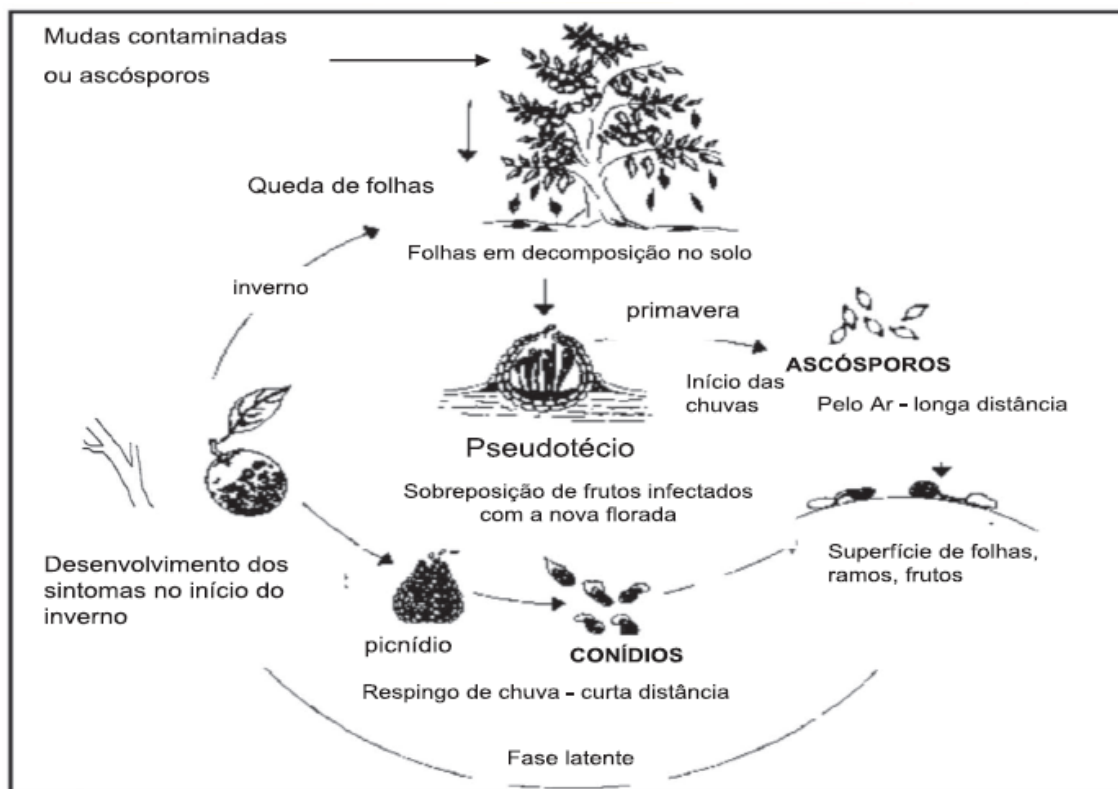


FIGURA 2 - CICLO DA MANCHA PRETA DOS CITROS EM CAMPO
FONTE: SEAB

Neste trabalho foram investigados os mecanismos que desencadeiam a reação sexual entre isolados de *Phyllosticta citricarpa*, obtidos de diferentes regiões geográficas e hospedeiros, buscando reconhecer sistemas de compatibilidade existentes. Genes envolvidos na reação sexual (*mating types*) foram identificados após a construção de *primers* específicos para esta espécie, com o objetivo de caracterizar este importante fitopatógeno quanto à dinâmica de recombinação possível em campo. As amplificações específicas foram aplicadas de forma a investigar a distribuição de ambos os *mating types* entre isolados do campo e assim abordar uma questão importante no ciclo da Mancha Preta dos Citros, a fase sexual do fungo dentro do ciclo da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados fúngicos (QUADRO 1) utilizados pertencem ao acervo biológico do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Isolado	Espécie	Localidade	Substrato	Hospedeiro	Método de compatibilidade
LGMF1	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Conchal - SP	Fruto	Lima ácida (Limão Taiti); <i>Citrus latifolia</i>	1; 2; 3
LGMF2	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Conchal - SP	Folha	Lima ácida (Limão Taiti); <i>Citrus latifolia</i>	1; 2
LGMF3	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Conchal - SP	Fruto	Lima ácida (Limão Taiti); <i>Citrus latifolia</i>	1; 2; 3
LGMF4	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Conchal - SP	Folha	Lima ácida (Limão Taiti); <i>Citrus latifolia</i>	1; 2; 3
LGMF5	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Conchal - SP	Fruto	Lima ácida (Limão Taiti); <i>Citrus latifolia</i>	1; 2; 3; 6
LGMF6	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Conchal - SP	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1; 2; 3; 4; 5; 7
LGMF8	<i>Phyllosticta citribraziliensis</i>	Rio Negro - PR	Folha	Limão; <i>Citrus</i> sp	1; 2
LGMF13	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Paranavaí - PR	Folha	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1
LGMF20	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1; 2
LGMF22	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1
LGMF24	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF25	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF28	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF30	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF31	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF32	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF33	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF34	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF35	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF36	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1; 2; 3
LGMF38	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	

LGMF40	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF41	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	3
LGMF44	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF45	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF46	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF48	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	4; 5
LGMF49	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	4; 5
LGMF50	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF52	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	3; 6
LGMF54	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF55	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF56	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF57	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF59	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF60	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF61	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF62	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF64	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF65	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF66	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF67	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF69	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF72	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF74	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF75	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF76	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3; 6
LGMF78	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	

LGMF80	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF81	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF82	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF83	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF85	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF86	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF87	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF88	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF89	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF90	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF91	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF92	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3
LGMF93	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF96	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF97	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF98	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF101	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF102	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF103	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF104	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF105	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF106	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF108	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF109	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF110	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF111	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1

LGMF112	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF113	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF114	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	6
LGMF117	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF119	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF122	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF123	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	7
LGMF124	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF127	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF128	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF129	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF130	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	6
LGMF131	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF132	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF133	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF134	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF135	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF136	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF140	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	4; 5; 7
LGMF141	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF143	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF144	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF145	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF146	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF147	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF148	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	4; 5

LGMF149	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF150	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF151	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF152	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF153	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF154	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3
LGMF157	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF158	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF159	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	7
LGMF160	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF161	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF162	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	7
LGMF164	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF165	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF167	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF169	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF170	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	7
LGMF171	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF173	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF174	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF175	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF177	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF179	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF180	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF181	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 2

LGMF183	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF187	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3
LGMF189	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3
LGMF193	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF194	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Cerro Azul	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF202	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF203	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF204	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF205	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF206	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF209	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF210	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF211	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF227	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	
LGMF231	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Pompéia	Folha	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1; 2
LGMF237	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Nova América da Colina	Folha	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	1
LGMF241	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	1
LGMF243	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	
LGMF245	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	7
LGMF246	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	
LGMF247	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	7
LGMF248	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	
LGMF251	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	
LGMF252	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	7
LGMF254	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	7
LGMF255	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	

LGMF256	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	7
LGMF258	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	
LGMF262	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Cerro Azul	Folha	Lima ácida (Limão Thaiti); <i>Citrus latifolia</i>	1
LGMF276	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Rolândia	Folha	Tangerina mexicana; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF278	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF279	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF280	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 2
LGMF283	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF285	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF293	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	
LGMF301	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF309	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1; 3
LGMF315	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Dr. Ulysses	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	1
LGMF364	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Cerro Azul	Folha	Manga; <i>Mangifera indica</i>	1

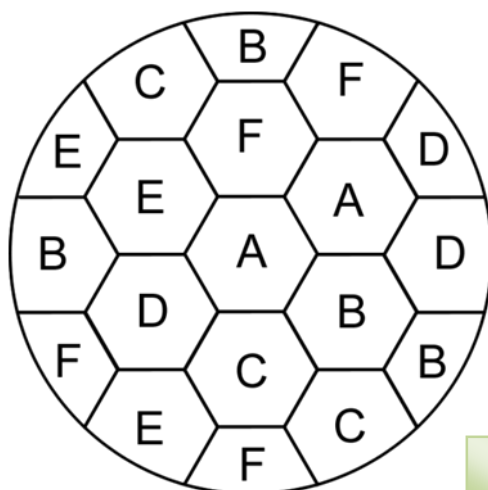
QUADRO 1 - ISOLADOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DOS GENES MAT E TESTES DE COMPATIBILIDADE DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL, DIFERENTES HOSPEDEIROS E SUBSTRATOS.

FONTE: A autora (2014).

2.1 COMPATIBILIDADE VEGETATIVA

2.1.1 Método 1

Para a primeira análise de compatibilidade vegetativa, foi utilizada a metodologia descrita por Burgess *et al.* (2009) onde seis isolados são inoculados simultaneamente em uma placa de petri de forma que todos têm a oportunidade de contato com todos, conforme diagrama na Figura 3 A. Foram utilizados isolados de nove diferentes regiões e nove hospedeiros crescidos em meio Citros (28g/L de folhas de citros lavadas, 20g/L de glicose, 15g/L de Agar, pH 5,8) que estão identificados no Quadro 1. O experimento foi avaliado a cada 15 dias, até 90 dias. A análise de compatibilidade foi feita por inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 40 vezes.



A

Table 1. The pairing schedule for 31 isolates in which each isolate is paired with itself and all other isolates in 31 Petri dishes.¹

Plate no.	Position on template					
	A	B	C	D	E	F
1	1	2	3	4	5	6
2	1	7	8	9	10	11
3	1	12	13	14	15	16
4	1	17	18	19	20	21
5	1	22	23	24	25	26
6	1	27	28	29	30	31
7	2	7	12	17	22	27
8	2	8	13	18	23	28
9	2	9	14	19	24	29
10	2	10	15	20	25	30
11	2	11	16	21	26	31
12	3	7	13	19	25	31
13	3	8	14	20	26	27
14	3	9	15	21	22	28
15	3	10	16	17	23	29
16	3	11	12	18	24	30
17	4	7	14	21	23	30
18	4	8	15	17	24	31
19	4	9	16	18	25	27
20	4	10	12	19	26	28
21	4	11	13	20	22	29
22	5	7	15	18	26	29
23	5	8	16	19	22	30
24	5	9	12	20	23	31
25	5	10	13	21	24	27
26	5	11	14	17	25	28
27	6	7	16	20	24	28
28	6	8	12	21	25	29
29	6	9	13	17	26	30
30	6	10	14	18	22	31
31	6	11	15	19	23	27

¹This design allows for cross checking (i.e., if isolate 1 has same VCG as isolate 11 and isolate 25 then isolate 11 and 25 should also be compatible).

B

FIGURA 3– MODELO EXPERIMENTAL DE BURGESS *et al.* (2009).

Notas A: representa a disposição dos isolados na placa de Petri. B: combinações possíveis entre os isolados nas placas.

FONTE: O autor (2012) **A** e Burgess *et al.* (2009) **B**.

2.1.2 Método 2

Foi desenvolvido com dois ou quatro isolados por placa e realizado nas seguintes condições: placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha de 10 mm de citros autoclavadas, em meio Ágar-água acrescido de 10% de Meio Completo e vedadas com uma camada de fita adesiva e outra de filme plástico PVC (FIGURA 4). Os isolados utilizados estão descritos no Quadro 1, e foram inoculados de tal forma que o encontro entre eles ocorresse no meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas a 28°C e no escuro. O experimento foi avaliado visualmente a cada sete dias, até 60 dias. As próximas metodologias utilizadas para avaliar a compatibilidade foram feitas de forma semelhante, porém com os isolados diferentes inoculados no extremo do mesmo disco de folha.

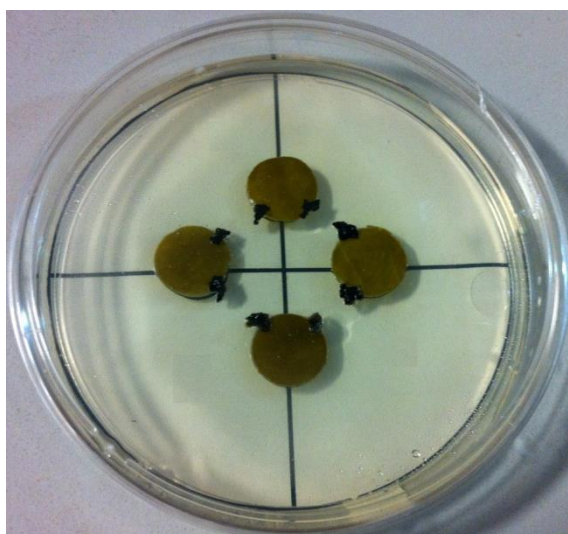


FIGURA 4 - MODELO DE PLACA DIVIDIDA EM QUATRO QUADRANTES MOSTRANDO DISCOS DE FOLHA DE CITROS, ONDE FORAM INOCULADOS OS ISOLADOS.
FONTE: A autora (2011)

2.1.3 Método 3

Foram utilizadas placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha autoclavados, em meio Ágar-água sem meio completo, vedadas com uma camada de fita adesiva e outra de filme plástico. Os isolados utilizados estão descritos no Quadro 1. As placas foram incubadas a 28°C e no escuro. O experimento foi avaliado a cada 7 dias, até 60 dias. A análise de compatibilidade foi feita por inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 40 vezes.

2.1.4 Método 4

Foram utilizadas placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha autoclavados, em meio aveia, sem meio completo, vedadas com uma camada de fita adesiva e outra de filme plástico. Placas foram incubadas a 28°C e escuro. Os isolados utilizados estão descritos no Quadro 1. Estes isolados foram selecionados por Montenegro (2010). O experimento foi avaliado a cada sete dias, até 60 dias. A análise de compatibilidade foi feita por inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 40 vezes.

2.1.5 Método 5

Foram utilizadas placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha autoclavados, em meio Aveia acrescido de biotina (6,4 ug/L). Esta vitamina é também essencial para o desenvolvimento sexual em certas espécies de *Chaetomium* e *Sordaria* (O'GORMAN *et al.*, 2009; BÖHM *et al.*, 2013). As placas foram vedadas com uma camada de fita adesiva e outra de filme plástico (BÖHM *et al.*, 2013). Os isolados utilizados estão demonstrados no Quadro 1. As placas foram incubadas a 28°C e no escuro. O experimento foi avaliado a cada 7 dias, até 90 dias. A análise de compatibilidade foi feita por

inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 40 vezes.

2.1.6 Método 6

Este método foi descrito por O'GORMAN *et al.* (2009) e apresenta as seguintes condições: placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha autoclavados, vedadas com uma camada de fita adesiva e outra de filme plástico PVC, testando diferentes meios de cultura e incubadas a 25°C e 28°C, temperaturas definidas neste trabalho. Linhagens utilizadas estão descritas no Quadro 1. As placas incubadas a 25°C foram submetidas a fotoperíodo 12h/12h. Os meios de cultura foram variados para oferecer diferentes condições aos fungos. Os meios testados foram: Ágar-água; Ágar-água acrescido de 10% de meio completo; Aveia; Aveia acrescido de biotina; BDA pH5,8 e 6,8; Citros pH5,8; Meio completo pH 5,8 e 6,8; Czapek pH7,2; MEA pH5,8. O experimento foi avaliado a cada 7 dias, até 90 dias. A análise de compatibilidade foi feita por inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 10 vezes. Após 25 dias foram feitas lâminas para visualização em microscópio binocular Olympus BX40 com câmera de captura DP071 de 12 megapixels acoplada e o de análise DP manager (disponibilizado pelo fabricante da câmera).

Para os experimentos 2.1.7 e 2.1.8 as linhagens foram selecionadas de acordo com resultados moleculares obtidos por PCR, utilizando-se os *primers* específicos para os *loci* MAT de *Phyllosticta citricarpa* (QUADRO 3).

2.1.7 Método 7

As condições estabelecidas foram: placas de Petri divididas em quatro quadrantes, com quatro discos de folha autoclavados, vedadas com camada de parafilm, em meio completo pH 5,8 incubadas a 25°C submetidas a fotoperíodo

12/12h. As linhagens utilizadas estão descritas no Quadro 1. O experimento foi avaliado a cada 7 dias, até 60 dias de incubação. A análise de compatibilidade foi feita por inspeção visual, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em aumento de 40 vezes.

Todas as análises de compatibilidade cruzamento em placa foram avaliadas periodicamente para a verificação do desenvolvimento de pseudotécio, a fim de identificar a fase sexual da *Phyllosticta citricarpa in vitro*. As placas foram avaliadas até a desidratação total do meio de cultura.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DOS *LOCI* de *mating types*

Foram utilizados vários isolados de *P. citricarpa* (Quadro 1) para a identificação dos *loci* de *mating types*. Estes isolados foram selecionados com base nos resultados obtidos nos experimentos de compatibilidade.

2.2.1 Triagem com *primers* degenerados para MAT 1-1-1 e MAT 1-2-1.

A partir dos métodos 3 a 6 as linhagens utilizadas nos experimentos foram selecionadas e submetidas a testes de amplificação dos genes por PCR. Foram utilizados *primers* degenerados (QUADRO 2) e as condições de amplificação descritas por Santos *et al.* (2010). Visando avaliar a melhor temperatura de anelamento para os pares de *primers* propostos, foi realizada uma PCR com gradiente de temperatura de anelamento, variando entre 54°C e 66°C.

Genes	Primers
	Sequência 5' - 3'
MAT 1-1-1	MAT 1-1-1RV (5'-GTCTMTGACCARGACCATG-3')
	MAT 1-1-1FW (5'-GCAAMIGTKTIKACTCACA-3')
MAT 1-2-1	MAT 1-2-1RV (5'-TTGACYTCAGAAGACTTGCGTG-3')
	MAT 1-2-1FW (5'-GCCCKCCYAAYCCATTCATC-3')

QUADRO 2 - PRIMERS DEGENERADOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO MAT 1-1-1 E MAT 1-2-1.

FONTE: Santos *et al.* (2010).

Nota: Y=Citosina / Timina; K=Guanina / Timina; M= Adenina / Citosina; R= Adenina / Guanina I= Adenina / Guanina.

2.2.2 Desenho de *primers* específicos para MAT1-1-1 e amplificação por PCR

Para a construção de *primers* específicos de detecção dos tipos de *mating type* para *P. citricarpa*, foi realizada uma análise *in silico* com o auxílio da ferramenta Primer-BLAST (COULOURIS *et al.*, 2009). Para MAT 1-1-1 (QUADRO 3) foi utilizada como base a linhagem *Phyllosticta citricarpa* CGMCC3.14348 (GenBank Assembly ID: GCA_000382785.1).

A amplificação para MAT 1-1-1 ocorreu em uma reação contendo Tampão 1X de PCR, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 µM de cada *primer* e 0,8 U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 25 µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados foram: 94°C por 30 segundos, seguido de 40 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. A avaliação do resultado foi em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed® e visualizado sob luz UV (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentado (Digidoc it software).

2.2.3 MAT 1-2-1 desenho de *primers* específicos e amplificação por PCR

Com relação ao MAT 1-2-1 (QUADRO 3) foi utilizado o *draft* do genoma de um isolado de *P. citricarpa* gentilmente cedido pelo Dr. Marcos Antônio Machado, do Centro de Citricultura APTA Citros do IAC-Cordeirópolis.

A amplificação para MAT 1-2-1 ocorreu em uma reação contendo Tampão 1X de PCR, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 µM de cada *primer* (MAT-2 17R, MAT-2 17F) e 0,8 U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 25 µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados foram: 94°C por 30 segundos, seguido de 40 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. A avaliação do resultado foi em gel de agarose 1%, corado com GelRed® e visualizado sob luz UV (Ultraviolet Benchtop Transilluminators) e fotodocumentado (Digidoc it software).

2.4 Sequenciamento e identificação do *locus* MAT

O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio método de Raeder e Broda (1985) adaptado por Glienke (1999) e também extração UltraClean® microbial DNA Isolation Kit (MO BIO®). Para o sequenciamento do gene MAT1-2-1 e MAT1-1-1 foram utilizados na primeira PCR os *primers* descritos no Quadro 3. Os produtos da PCR foram purificados com as enzimas Exo 01 e Fast AP (*ThermoScientific kit*) conforme descrição do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada novamente com os *primers* do Quadro 3. A purificação do DNA foi feita por Sephadex™ G-50 DNA e a eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático de DNA modelo ABI PRISM 3500 Genetic Analyser.

GENE	Primer	Sequencia 5` - 3`
MAT 1-1-1	MAT 01R	5'AAGAGACGTGTGCGCCATTGT3'
	MAT 01F	5'AGCCCTCTACGAGCTCTCAA3'
	MAT 07R	5'AGGAATCTGTCAAGCGGAGC3'
	MAT 07F	5'CCAATGTTCCTCACGTTGCG3'
	MAT 09F	5'ACGGTCGCCTTACATGACTC3'
	MAT 09R	5' CCGGATGATTGACCATGCCT3'
	MAT 16R	5'GAGGCGTGTTCATTGGTAGGT3'
	MAT 16F	5'GCGAAGTGGAGCATCATTGC3'
	MAT19F	5'CTACCAATGACACGCCTCCA3'
	MAT19R	5'CGCGGTGGAATGATGAACAG3'
MAT 1-2-1	MAT 17 F	5'TGTTAATTGTTGCGCCGAGC3'
	MAT 17 R	5'GAAGCGAAGGAGTTTTGGCG3'

QUADRO 3 - *PRIMERS* DESENHADOS PARA A DETECÇÃO DOS *loci* MAT EM *P.citricarpa*.
 FONTE: A autora (2014).

Para a confirmação do MAT 1-1-1 foi construída uma sequência consenso no programa Mega5 (TAMURA *et al.*, 2010) unindo todos os fragmentos amplificados. Para comparar as sequências obtidas com o banco de dados foi utilizada a plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTx) do NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTES DE COMPATIBILIDADE

A partir das metodologias testadas foi calculada a porcentagem de compatibilidade entre os isolados testados. Dados representados no Gráfico 1.

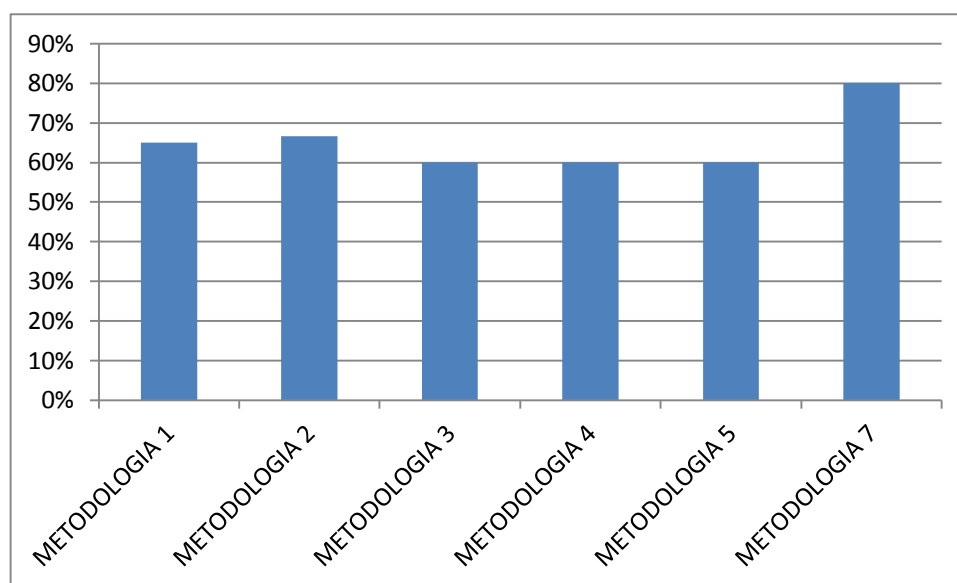


GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS ISOLADOS TESTADOS NAS DIFERENTES METODOLOGIAS UTILIZADAS.

NOTA: a compatibilidade foi considerada quando houve contato micelial entre os isolados.

FONTE: A autora (2014).

O método 1, Burgess *et al.* (2009), contribuiu com uma taxa de 65% de compatibilidade (GRÁFICO 1) entre os isolados nas condições testadas. Considerando o grande número de isolados testados nesta metodologia, obteve-se uma porcentagem semelhante às outras metodologias. Entretanto não significa que esta metodologia foi eficiente para *Phyllosticta*. Apesar da grande vantagem deste protocolo em ensaiar um grande número de isolados em um número reduzido de placas, a presença de muitos isolados em uma mesma placa de Petri influenciou o crescimento micelial, alterando a morfologia dos isolados. Sendo assim, nos próximos experimentos optou-se por inocular poucos isolados por placa.

No método 2 as placas foram vedadas assim como citado por O’Gorman *et al.* (2009) para evitar trocas gasosas e aumentar o estresse ambiental. Sob estas condições a reação sexual de *P. citricarpa* não foi observada. De todas as colônias ensaiadas, 66,7% dos isolados (GRÁFICO 1) apresentaram compatibilidade, ou seja, tiveram contato micelial.

A método 3 ocorreu sem o acréscimo de 10% de meio completo, deixando o meio de cultura com menos nutrientes, o que poderia forçar a realização da reação sexual. Obteve-se mais de 50% de contato micelial entre os isolados

testados neste experimento, mas o fator desencadeante para a reação sexual não foi contemplado.

O método 4 foi aplicado semelhante ao 3, e o critério utilizado para a escolha dos isolados foi baseada em ensaios anteriormente descritos por Montenegro (2010) onde estes isolados não produziram halo amarelo em meio de cultura de aveia após aproximadamente 7 dias de crescimento no escuro (BAAYEN *et al.*, 2002). Portanto estes isolados poderiam ter um diferencial realizando a reação sexual quando confrontados. Após 60 dias de análise não surgiram corpos de frutificação. Dos isolados testados apenas LGMF 06 e LGMF 49 não apresentaram compatibilidade. As metodologias 3, 4 e 5 apresentaram uma taxa de 60% de compatibilidade (GRÁFICO 1) nas condições e isolados testados em cada um dos experimentos.

Na metodologia 6 foram testados diversos meios de cultura descritos para *Aspergillus fumigatus* (O'GORMAN *et al.*, 2009) expondo *P. citricarpa* aos mais diversos nutrientes e pHs (GRÁFICO 2).

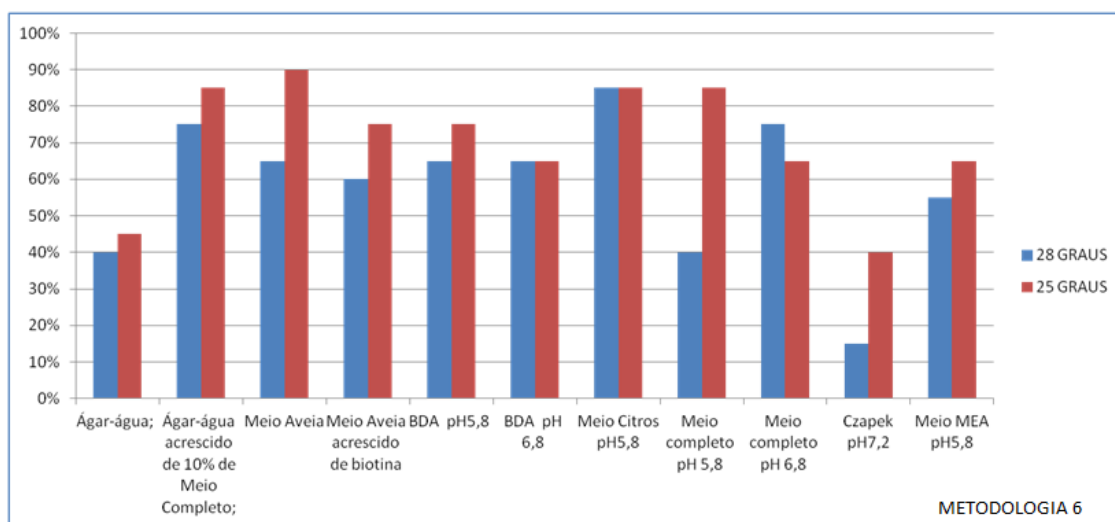


GRÁFICO 2 - DIFERENTES CONDIÇÕES E TEMPERATURAS TESTADAS PELA % DE COMPATIBILIDADE NA METODOLOGIA 6.

Na placa de meio completo pH 5,8 sob a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12/12h foi possível verificar uma estrutura semelhante a um pseudotécio imaturo formado entre os isolados LGMF 76 e LGMF 114, como demonstrado na Figura 5 e 6. Estes isolados amplificaram positivamente para o *primer* 17 correspondente ao MAT 1-2-1.

Nas metodologias acima citadas a temperatura de 28°C não foi satisfatória, pois não ocorreu nenhuma reação de compatibilidade. Então optou-se por realizar os experimentos seguintes nas condições de 25°C com fotoperíodo 12/12h.

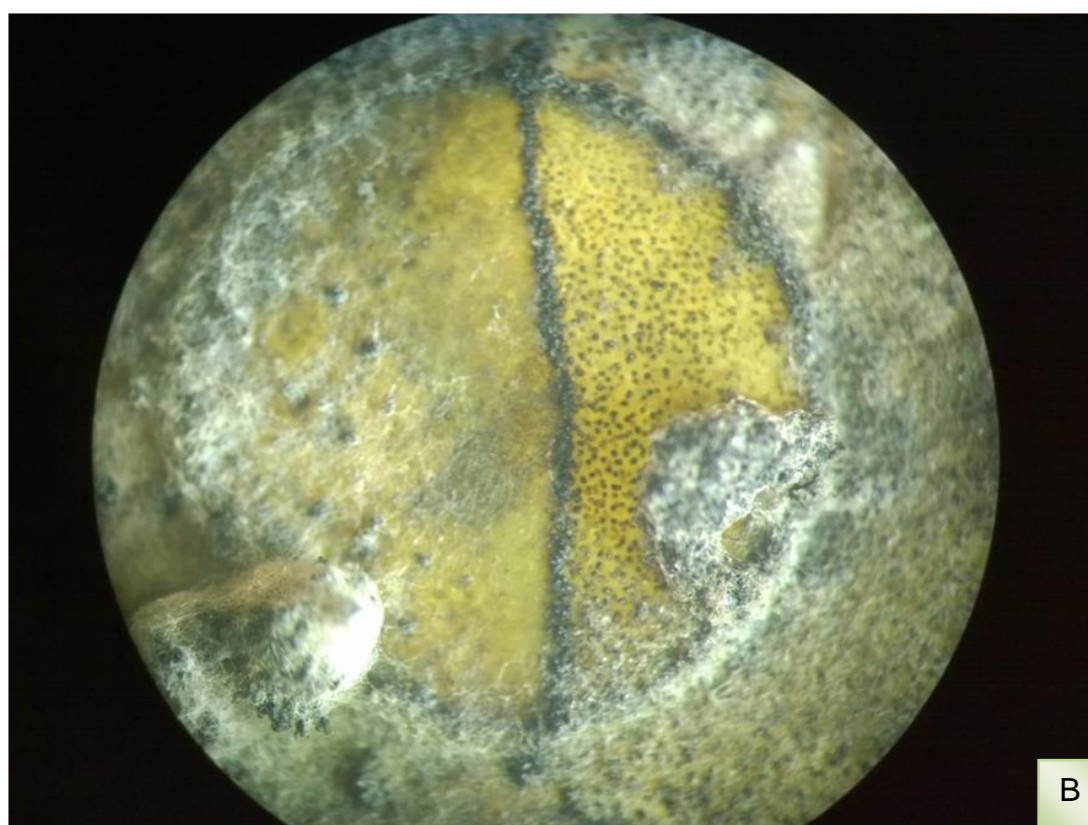
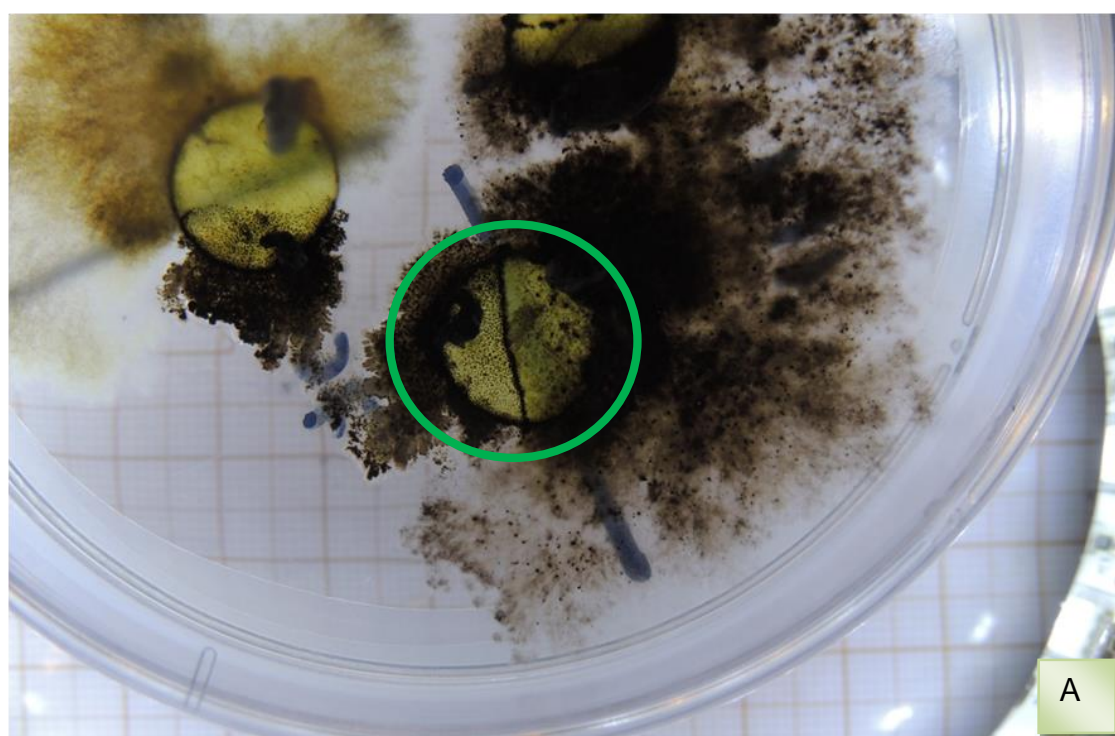


FIGURA 5 - A: VISÃO MACROSCÓPICA DOS ISOLADOS EM PLACA SOBRE DISCO DE FOLHA a 25°C B: DETALHAMENTO DA ZONA DE ENCONTRO DOS ISOLADOS COMPATIBILIDADE ENTRE LGMF 76 E LGMF 114.
FONTE: O Autor (2014)

Após 25 dias foi observada uma estrutura semelhante a um pseudotécio imaturo. (FIGURA 6).

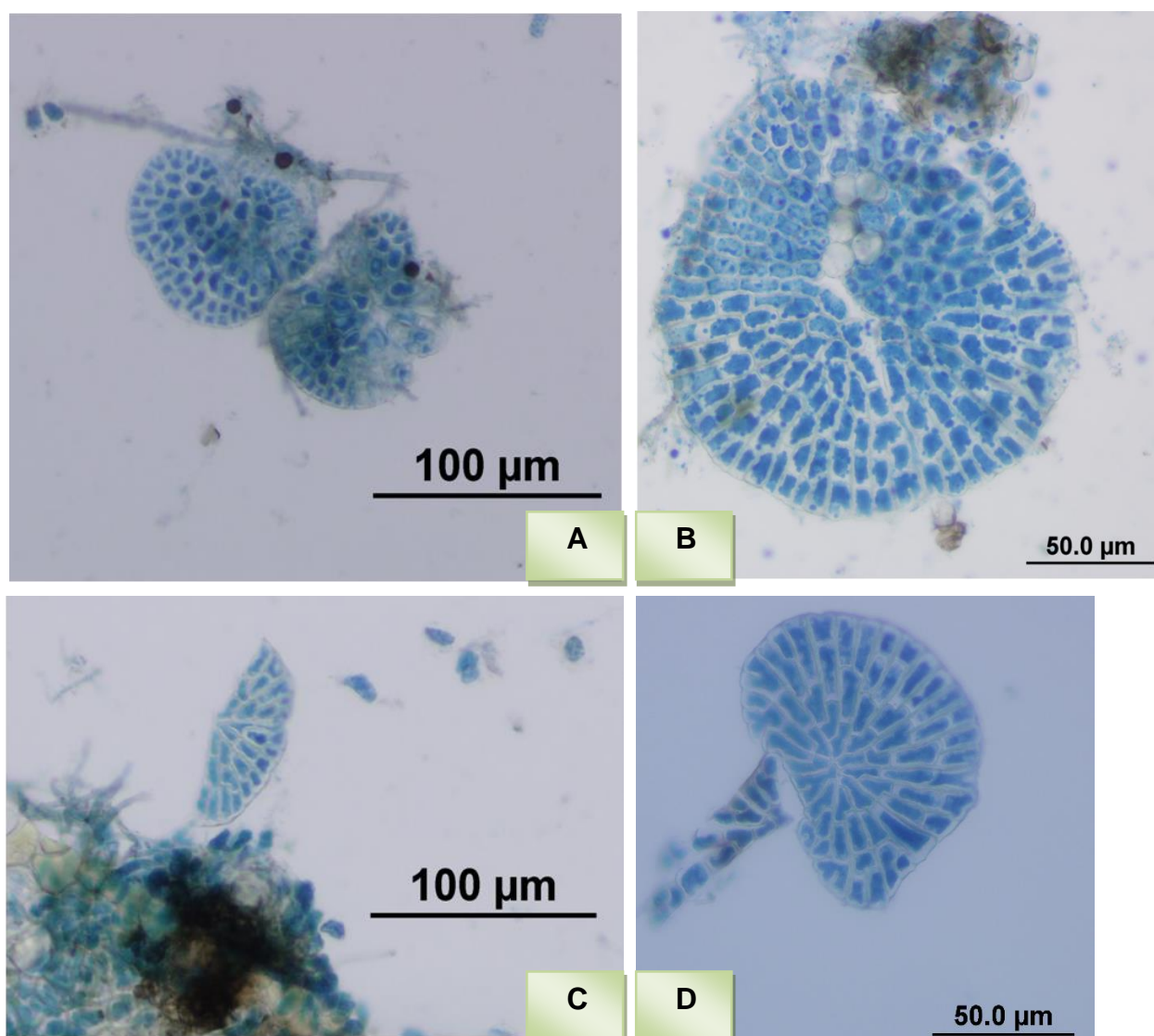


FIGURA 6- ESTRUTURAS OBSERVADAS A PARTIR DA REAÇÃO DE COMPATIBILIDADE ENTRE OS ISOLADOS LGMF76 E LGMF114
FONTE: A autora (2014).

A seleção dos isolados utilizados no método 7 foi realizada a partir do resultado de amplificação dos *primers* construídos no presente trabalho, onde foram selecionados isolados com produtos de amplificação contrastantes, como o esperado para fungos heterotáticos. Considerando a especificidade para os genes MAT de *P. citricarpa* esperava-se que confrontando isolados de *mating types* opostos, a fase sexual fosse observada, porém, se a hipótese de

heterotalismo for confirmada, algum fator desencadeante da reação sexual nesta espécie não foi contemplado nos ensaios realizados.

3.2 ANÁLISES MOLECULARES

De acordo com os resultados de amplificação com os *primers* descritos por Santos *et al.* (2010), o tamanho do fragmento esperado para Mat 1-1-1 seria de 141 pb e para MAT 1-2-1 de 229 pb. As avaliações dos resultados das amplificações foram realizadas em eletroforese com gel de agarose 1,5%, coradas com GelRed® e visualizado sob luz UV (Ultraviolet Bench top transilluminators) e fotografado (Digidoc it software).

As amplificações para o *locus* MAT 1-1-1 utilizando o par de *primer* degenerados descrito por Santos *et al.* (2009) não foi satisfatória, não permitindo o uso dele para as amplificações e análises futuras pois um grande número de bandas inespecíficas foi obtido, mesmo restringindo-se a reação com o aumento da temperatura de anelamento e com o uso de uma *Taq polimerase* de alta fidelidade.

Com relação ao *locus* MAT 1-2-1 as amplificações foram testadas com gradiente de temperaturas de anelamento (FIGURA 7) mostrando que em 60,4°C as bandas estavam melhor definidas. A partir disso, seguindo as condições de amplificação descritas por Santos *et al.* (2010) foram realizados alguns testes com o isolado LGMF 76 para posterior clonagem e sequenciamento do produto de amplificação utilizando o kit comercial pGEM-T Vector (Promega).

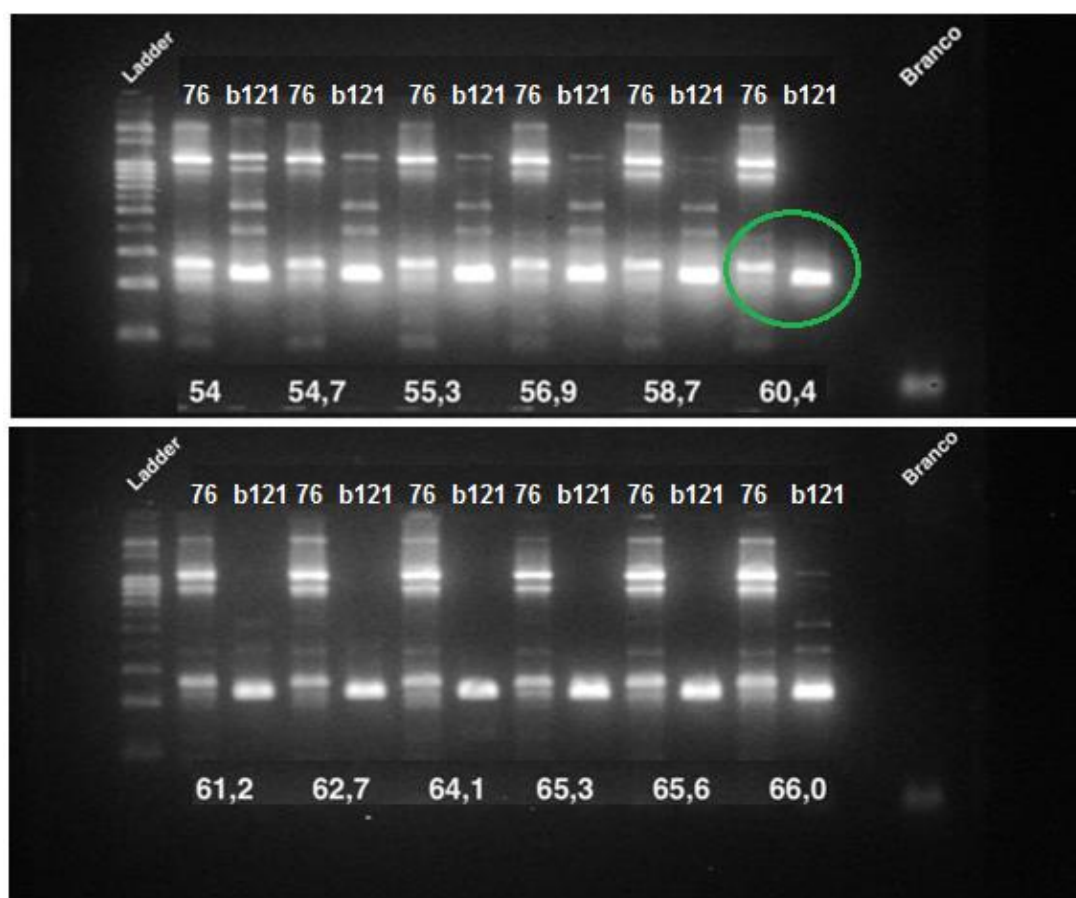


FIGURA 7 - GRADIENTE DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO UTILIZANDO O ISOLADO LGMF76 DE *Phyllosticta citricarpa* COM O PAR DE PRIMER MAT 1-2-1 AVALIADO EM GEL DE AGAROSE 1,5%.

FONTE: A autora (2014).

NOTA: A amostra b121 é controle *Diaporthe*. Os valores sob as canaletas simbolizam a temperatura (em graus Celsius) de anelamento na qual a amostra foi exposta.

A partir dos testes realizados com os *primers* descritos por Santos *et al.* (2010) isolados foram selecionados para os métodos 3, 4, 5, 6. Não houve reações de compatibilidade entre eles, sendo assim estes *primers* não foram efetivos para amplificações dos *loci* MAT de *Phyllosticta citricarpa*.

3.2 Desenhos de *primers* específicos *P. citricarpa* MAT1-1-1 e MAT1-2-1

A presença de MAT1-1-1 ou MAT1-2-1 em diferentes isolados é semelhante ao encontrado em outros Dothideomycetes heterotáticos que se reproduzem sexualmente (COPPIN *et al.*, 1997; PAOLETTI *et al.*, 2007). Estes

idiomorfos ocorreram em proporção diferente de 1:1. Dos 148 isolados testados, 114 isolados foram determinados MAT 1-2-1 (FIGURA 8), mostrando que dentre os isolados testados, este *mating-type* é o mais comum para *P. citricarpa* contrastando com os resultados obtidos com *Diplodia pinea* (BIHON *et al.*, 2014). A amplificação do *loci mating-type* de isolados de *Diplodia pinea* coletados em quatro países de quatro continentes diferentes mostrou que a frequência do MAT1-1-1 para MAT1-2-1 não difere da proporção de 1:1 (BIHON *et al.*, 2014), o que é esperado em populações com cruzamentos ao acaso (PAOLETTI *et al.*, 2007; GROENEWALD *et al.*, 2006). Ainda segundo Bihon *et al.* (2014) os resultados são surpreendentemente consistentes dado que as populações estudadas foram em locais onde o patógeno foi introduzido.

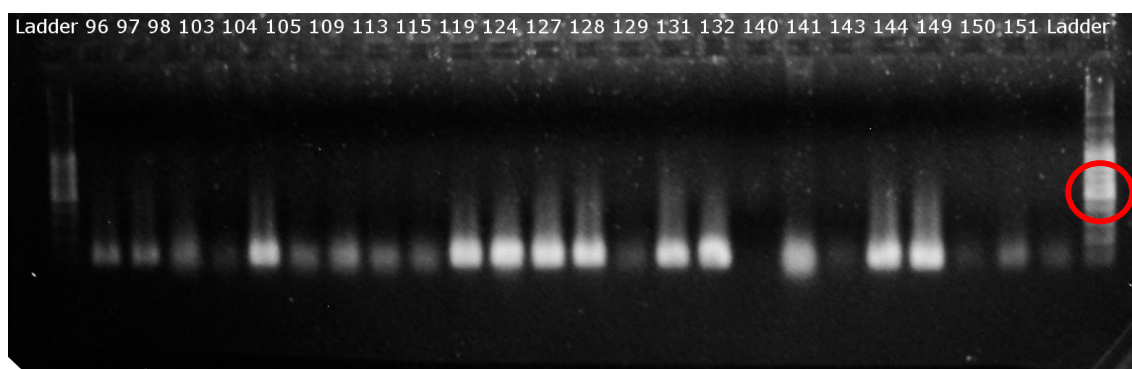


FIGURA 8- PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE MAT 1-2-1 EM LINHAGENS DE *P.citricarpa* EM GEL DE AGAROSE 1%

FONTE: O Autor (2014)

NOTA: A banda esperada tem 85 pb. O marcador *Ladder* é de 100pb e a banda destacada tem 500pb. Os números acima das canaletas correspondem ao código LGMF que identificam os isolados pertencentes ao material biológico do LabGeM.

Dos isolados testados 4, amplificaram com o *primer* 17 (QUADRO 3), apresentando duas bandas, como mostrado na Figura 8. Para realizar o sequenciamento dos produtos amplificados, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T Vector (Promega) protocolo do fabricante. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados *Genbank* com o auxílio da ferramenta BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997), obtendo-se similaridade com a proteína de domínio HMG relacionado ao MAT1-2-1. Portanto estes isolados foram efetivamente considerados como pertencentes ao grupo dos isolados com *mating type* 1-2-1.

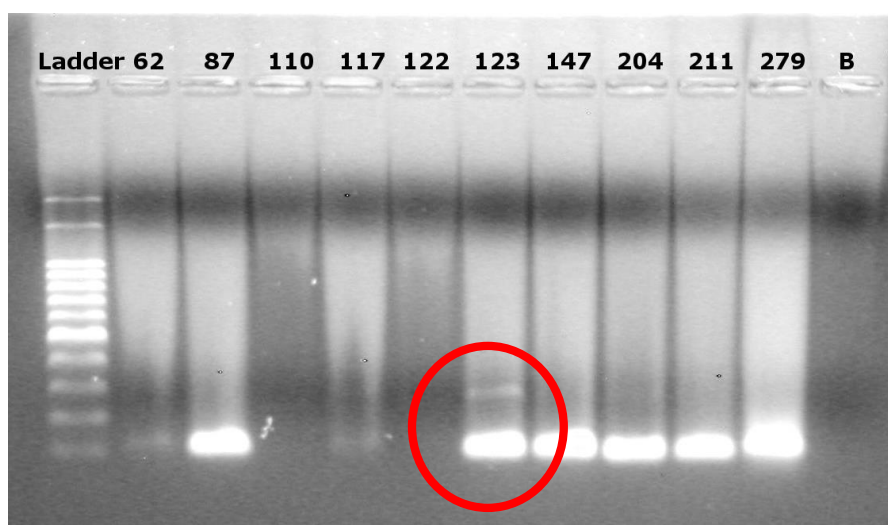


FIGURA 9 - ISOLADO DESTACADO MOSTRANDO DOIS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDOS COM O PAR DE *PRIMER* 17.
FONTE: A autora (2014).

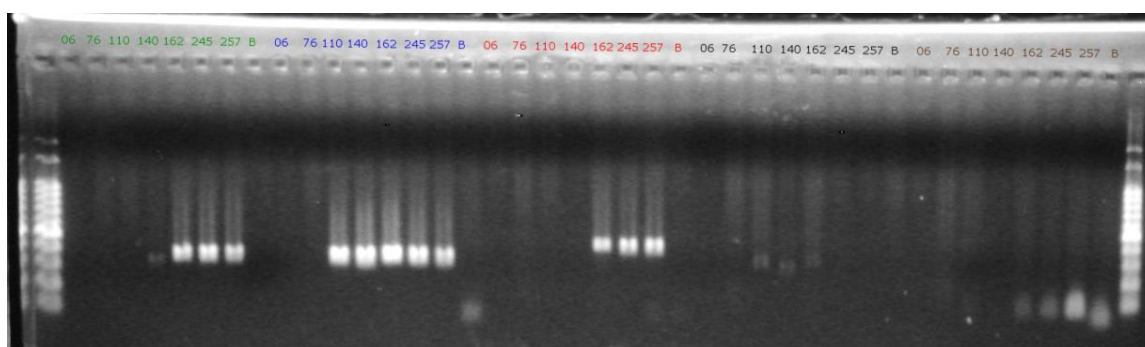


FIGURA 10 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE MAT 1-1-1 EM LINHAGENS DE *P. citricarpa* EM GEL DE AGAROSE 1%.
FONTE: A autora (2014).

Notas: As linhagens utilizadas são: LGMF 06, 76, 245 e 256 as quais amplificaram com o *primer* 17 (controle negativo). As LGMF 110, 140 e 162 não amplificaram com o *primer* 17. "B" são os brancos. Em verde *primer* 1 (356 pb), azul *primer* 7 (330 pb), vermelho *primer* 9 (396 pb); preto *primer* 16 (306 pb); marrom *primer* 19 (85 pb)

Levando em consideração as amplificações específicas este estudo fornece evidências de que *P. citricarpa* é um fungo heterotático, necessitando dos dois *mating types* para a reação sexual. Isto é evidente a partir da identificação de idiomorfos MAT contendo genes MAT1-1-1 ou MAT1-2-1.

A partir da identificação de isolados de *mating types* opostos, estes foram selecionados para testes em placa de Petri. No entanto, o corpo de frutificação sexual não foi observado, apesar de todas as análises de compatibilidade para induzi-los, com o uso de isolados de diferentes tipos de pareamentos em diferentes condições.

O fato de a reação sexual estar envolvida na disseminação da MPC e da maior prevalência do MAT 1-2-1 talvez seja um indício da importância desse desequilíbrio. Levando-se em consideração a prevalência do tipo MAT 1-2-1 no isolados testados, é possível indicar que este *mating type* tenha algum tipo de vantagem em relação ao fungo MAT 1-1-1 na relação de interação com a planta (GRÁFICO 3) (FIGURA 11). Em 2007, Bain *et al.* realizaram um estudo com *A. fumigatus* onde também foi encontrado uma prevalência do MAT 1-2-1 nos isolados analisados. Esta distribuição não equilibrada parece sugerir uma diferença sexual entre os tipos de *A. fumigatus* relacionado com sua virulência. Álvarez-Pérez *et al.* (2009) descrevem que o estudo da possível relação entre a reprodução sexual e virulência no caso de *A. fumigatus* e outros fungos patogênicos, se mostra importante como um campo para concentrar pesquisas para melhor entendimento sobre impacto e epidemiologia de doenças causadas por estes fungos.

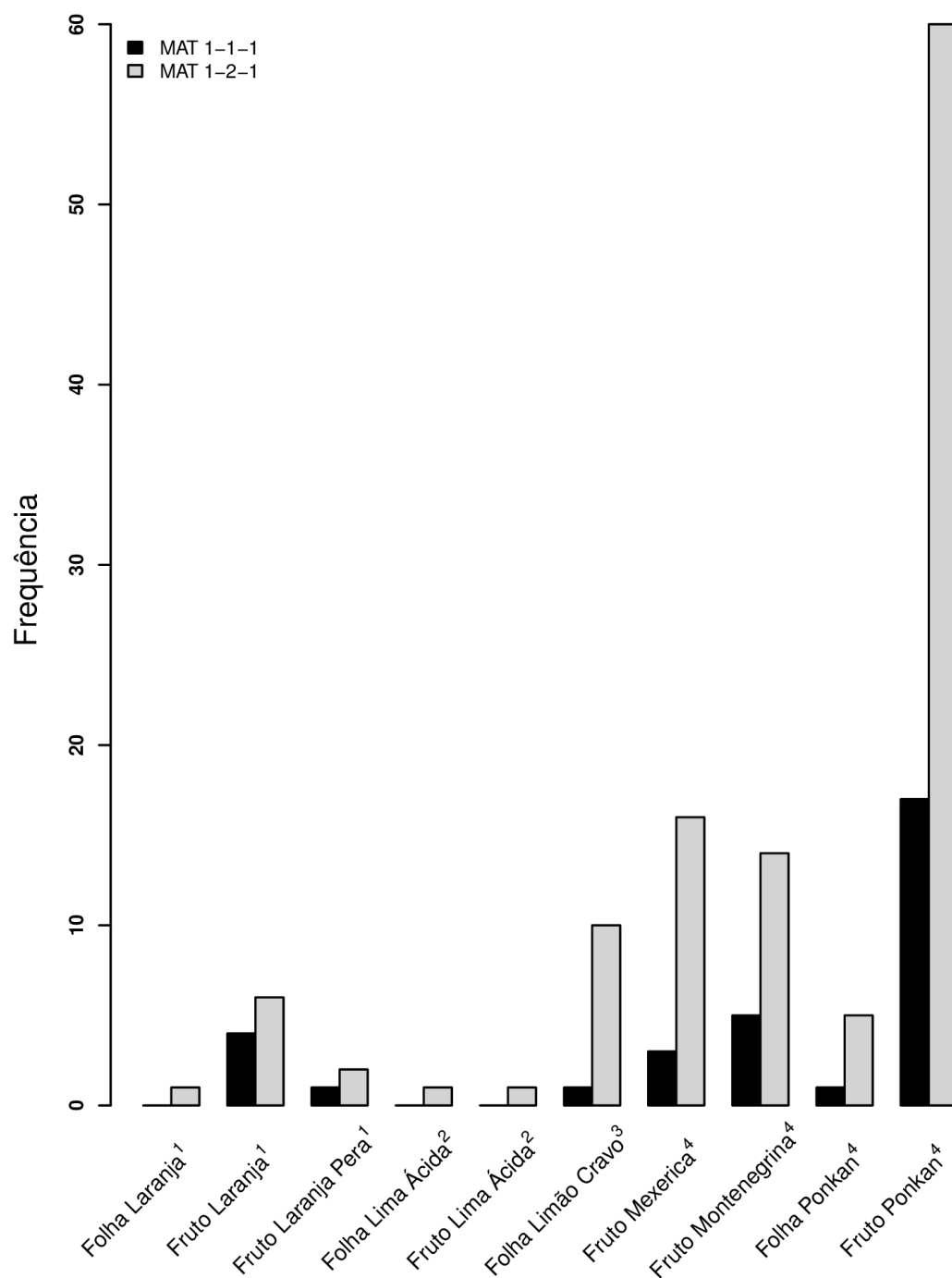


GRÁFICO 3 - AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DOS DIFERENTES *MATING TYPES* DE *Phyllosticta citricarpa* EM DIFERENTES VARIEDADES DE HOSPEDEIRO E SUBSTRATO.
 NOTA: 1-*Citrus sinensis* L. Osbeck; 2-*Citrus latifolia*; 3-*Citrus limonia* Osbeck; 4-*Citrus reticulata* Blanco

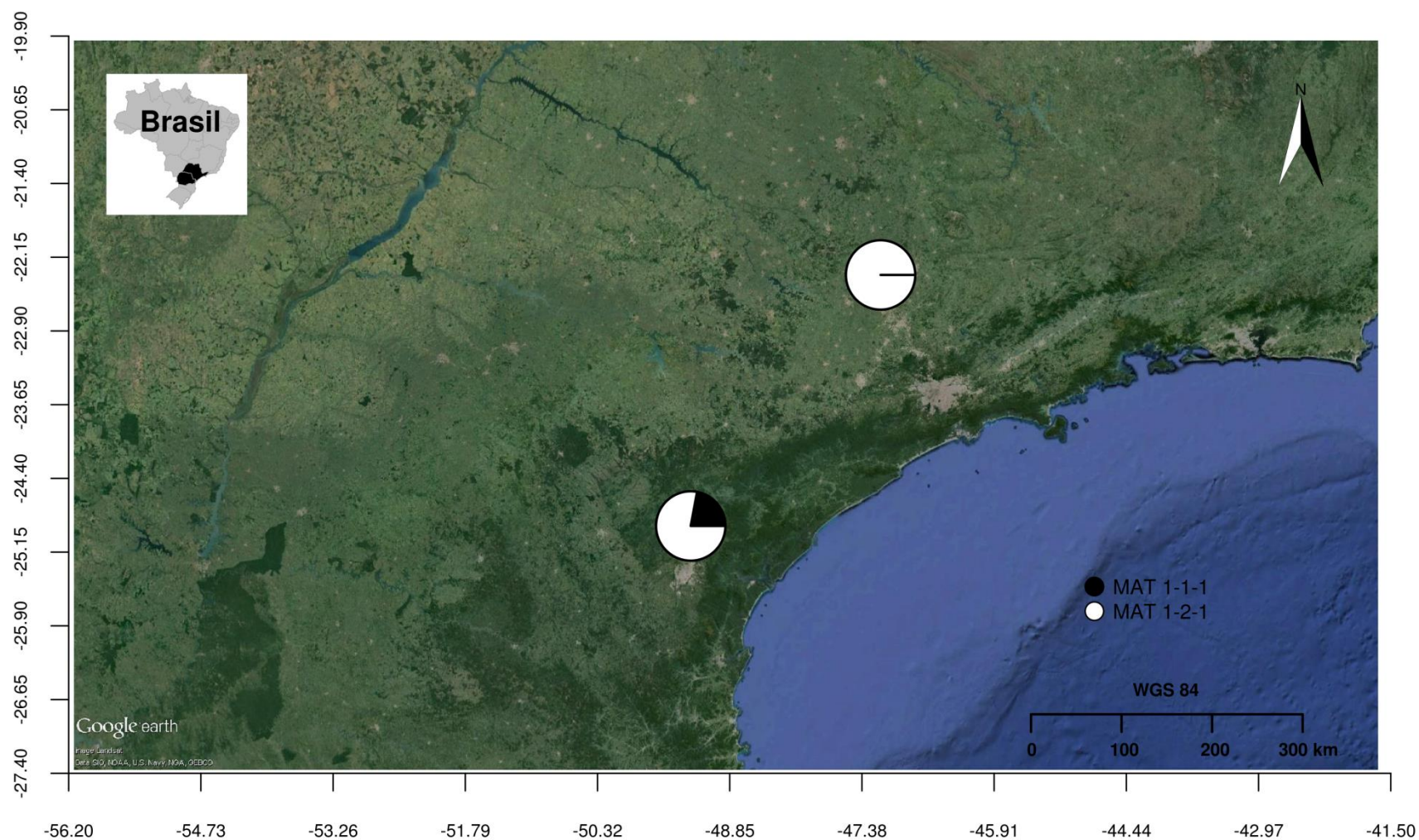


FIGURA 11 - LOCALIZAÇÃO NO BRASIL DOS ISOLADOS DOS DIFERENTES *MATING TYPES*
NOTA : LOCALIZAÇÕES EXATAS ESTÃO DESCRITAS NO QUADRO 4

		MAT 1-1-1	MAT 1-2-1		ORIGEM		
	Táxon			Localidade	Substrato	Hospedeiro	Latitude, longitude
LGMF4	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Conchal -SP	Folha	Lima ácida (Limão Thaiti); <i>Citrus latifolia</i>	-
LGMF5	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Conchal -SP	Fruto	Lima ácida (Limão Thaiti); <i>Citrus latifolia</i>	-
LGMF6	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Conchal -SP	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-
LGMF20	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF22	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF24	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF25	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF28	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF30	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF31	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF32	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF33	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF34	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Cerro Azul	Fruto	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.883945,-49.283524
LGMF227	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Laranja; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF35	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.615809,-49.422226
LGMF36	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Dr. Ulysses	Fruto	Laranja Pera; <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	-24.615809,-49.422226
LGMF38	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.883945,-49.283524
LGMF40	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.883945,-49.283524
LGMF44	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.883945,-49.283524
LGMF45	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão dos Scheffer - Cerro Azul	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825359,-49.261111
LGMF46	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF48	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF49	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF50	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina mexerica; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

LGMF205	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF206	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF209	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF210	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF211	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Dr. Ulysses	Fruto	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.615809,-49.422226
LGMF278	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825359,-49.261111
LGMF279	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825359,-49.261111
LGMF280	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825359,-49.261111
LGMF283	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825554,-49.261605
LGMF293	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825554,-49.261605
LGMF309	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Quarteirão dos Órfãos - Cerro Azul	Folha	Tangerina Ponkan; <i>Citrus reticulata</i> Blanco	-24.825554,-49.261605
LGMF241	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF243	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF245	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF246	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF247	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF248	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		x	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF251	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF252	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	X		Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF254	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF255	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111
LGMF256	<i>Phyllosticta citricarpa</i>		X	Ribeirão do Scheffer - Cerro Azul	Folha	Limão Cravo; <i>Citrus limonia</i> Osbeck	-24.825359,-49.261111

QUADRO 4 - ISOLADOS DE *P.citricarpa* TESTADOS PARA OS DIFERENTES TIPOS DE *MATING TYPE* DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.
 FONTE: A autora (2014).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes de compatibilidade realizados permitiram concluir que não são todos os isolados de *P. citricarpa* que podem crescer próximos o suficiente ao ponto de haver o encontro de hifas. Portanto, o contato físico entre diferentes isolados faz-se necessário para permitir a ocorrência da reação sexual. Porém, entre outros isolados foi observada compatibilidade dependente do método empregado. Outro resultado com interpretação complexa foi a obtenção da estrutura semelhante a um pseudotécio imaturo entre os isolados LGMF 76 e LGMF 114. Após o teste de compatibilidade, estes isolados foram utilizados para amplificação dos genes de *mating type* para *primers* construídos no presente estudo. Surpreendentemente, ambos amplificaram para o gene MAT 1-2-1. Desta forma, a estrutura observada não é um pseudotécio imaturo ou *P. citricarpa* não é heterotático ou até mesmo o método para identificar os genes MAT 1-1-1 e MAT 1-2-1 não foi eficiente. Pode estar sendo identificado partes remanescentes de um destes genes, mas que não necessariamente estão íntegros e ou são funcionais. Outros genes de *mating types* estão sendo investigados no genoma deste fungo na expectativa de elucidar esta questão.

REFERÊNCIAS

AANEN, D.K.; HOEKSTRA, R.F. Why Sex Is Good: On Fungi and Beyond. Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications. p.527–534, 2007.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A A; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ALVAREZ-PEREZ, S.; BLANCO, J. L.; ALBA, P.; GARCIA, M. E. Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. **Med. Mycol**, v.26, p.1–6, 2009.

ARZANLOU, M.; CROUS, P. W.; ZWIERS, L.H. Evolutionary Dynamics of Mating-Type Loci of *Mycosphaerella* spp. Occurring on Banana. **Eukaryotic Cell**, v.9, p.164-172, 2010.

BAIN, J.M.; TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; JACOBSEN, M.D.; SHAW, D.; GOW, N.A.; ODDS, F.C. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, p.45, v.1469–77, 2007.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C. G.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, p. 464-477, 2002.

BIHON, W.; WINGFIELD, M.J.; SLIPPERS, B.; DUONG, T.A.; WINGFIELD, B.D. MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in a predominantly asexual and important pine pathogen. **Fungal Genet Biol**, v.62, p.55-61, 2014.

BILLIARD, S.; LO´PEZ-VILLAVICENCIO, M.; HOOD, M. E.; T. GIRAUD, T. Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. **J . Evol. Biol**, v.25, p.1020–1038, 2012.

BÖHM, J.; HOFF, B.; O'GORMAN, C.M.; WOLFERS, S.; KLIX, V.; BINGER, D.; ZADRA, I.; KÜRNSTEINER, H.; DYER, P.S.; KÜCK, U.; Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. **Proc Natl Acad Sci** v.110, p.1476-813, 2013.

BURGESS, T.; WUBETU BIHON, W.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D. A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi **Mycologia**, v.60, n.6, 2009.

COPPIN, E.; DEBUCHY, R.; ARNAISE, S.; PICARD, M. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.61, p.411–428, 1997.

COPPIN, E. R.; DEBUCHY, S.; ARNAISE, AND M. PICARD. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 411–428, 1997/474, 2009.

COULOURIS, C.; AVAGYAN, G.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T.L. BLAST plus: architecture and applications. **BMC Bioinforma**, v.10, p421, 2009.

DEBUCHY, R.; TURGEON, B.G. Mating-type structure, function, and evolution in Euscomycetes, in *The Mycota I Growth, Differentiation, and Sexuality*. **Springer-Verlag**, p. 293–323, 2006

DEBUCHY, R.; V. BERTEAUX-LECELLIER; P. SILAR; Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**, p. 501–535, 2010.

DEVIER, B.; AGUILETA, M.; HOOD; GIRAUD, T. Ancient transspecific polymorphism at pheromone receptor genes in Basidiomycetes. *Genetics*, v.181, p.209–223, 2009

DIEPENINGEN, A.D.; VARGA, J.R.F.; HOEKSTRA, D. A.J.M. Mycoviruses in *Aspergilli*. In: Samson R, Varga J, editors. *Aspergillus in the genomics era*. **Wageningen Academic Publishers** v.23, p.133–176, 2008.

GLASS, N. L. ; STABEN, C. Genetic control of mating in *Neurospora crassa*. **Sems. Dev. Bioi.** v.1, n.1, p.77-84, 1990.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GOUYON, P.H. Sex: a pluralist approach includes species selection. (One-step beyond and it is good). **J. Evol. Biol**, v.12, p.1029–1030, 1999.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J.Z.; HARRINGTON, T.C.; ABELN, E.C.A.; CROUS, P.W. Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. **Fungal Genet. Biol.**, v.43, p.813–825, 2006

HEITMAN, J.; SUN, S.; JAMES, T.Y. Evolution of fungal sexual reproduction. **Mycologia**, v.105, n.1, p.1-27, 2013.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948.

KLIX, V.; NOWROUSIAN, M.; RINGELBERG, C.; LOROS, J.J.; DUNLAP, J.C.; POÖGELER, S. Functional Characterization of *MAT1-1*-Specific Mating-Type Genes in the Homothallic Ascomycete *Sordaria macrospora* Provides New Insights into Essential and Nonessential Sexual Regulators. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n.6, p. 894–905, 2010.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981.

KRONSTAD, J. Self-Fertility: The Genetics of Sex in Lonely Fungi. **Current Biology**, v.17, p.844, 2007.

LEE, S.C.; N.I.; M., LI W, SHERTZ, C.; HEITMAN, J. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.74, n.2, p. 298-340, 2010.

LIM, Y. W.; ALAMOUTI, S.M.; KIM, J.; LEE, S.; BREUIL, C.; Multigene phylogenies of *Ophiostoma clavigerum* and closely related species from bark beetle-attacked *Pinus* in North America. **FEMS Microbiol. Lett.** v.237, p.89–96, 2004

LÓPEZ-VILLAVICENCIO, M.; DEBETS, A.J.; SLAKHORST, M.; GIRAUD, T.; SCHOUSTRA, S.E. Deleterious effects of recombination and possible nonrecombinatorial advantages of sex in a fungal model. **J Evol Biol.** v.26, n.9, p, 1968-78, 2013.

METZENBERG, R.L.; GLASS, N.L. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. **Bioessays**, v.12, p.53-50, 1990.

MONTENEGRO, D.H. **Rna dupla fita em *Guignardia citricarpa*: obtenção, cura, transmissão e alterações fenotípicas.** 93f. Dissertação (mestrado em

genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010

NOLTING, N., AND S. POGGELER. A MADS box protein interacts with a mating-type protein and is required for fruiting body development in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. **Eukaryot. Cell**, v.5, p.1043–1056, 2006.

O’GORMAN, C.M.; FULLER, H.T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v.457, p. 471, 2009.

PAOLETTI, M., SEYMOUR, F.A., ALCOCER, M.J.C., KAUR, N., CALVO, A.M., ARCHER, D.B., AND DYER, P.S. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**, v. 17, p.1384–1389, 2007.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.(2013)

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid Preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. v. 1, p. 17-20, 1985.

REGO C. AND OLIVEIRA H. 2007. “Black Rot” da videira causado por *Guignardia bidwellii*. *Actas do 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 23 a 25 de Maio, Évora, 107-114.

RYDHOLM, C.; DYER, P.S.; LUTZONI, F. DNA sequence characterization and molecular evolution of MAT1 and MAT2 mating-type loci of the self-compatible ascomycete mold *Neosartorya fischeri*. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.868- 874, 2007.

SANTOS, M.J.; CORREIA, V.G.; PHILLIPS, A.J.L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology**, v.114, p.255-270, 2010

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; FILHO, A. B.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 57, p. 103-108, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0, 2010.

TURGEON, B.G.; YODER, O. C. Proposed Nomenclature for Mating Type Genes of Filamentous Ascomycetes. **Fungal Genetics and Biologyn**, New York, v.31, p. 1–5, 2000.

TSUI, C. K. M.; DIGUISTINI,S.; WANG, Y.; FEAU, N.; DHILLON,B.; BOHLMANN,J.; HAMELIN,R.C. Unequal Recombination and Evolution of the Mating-Type (MAT) Loci in the Pathogenic Fungus *Grosmannia clavigera* and Relatives, **G3 Betesda** v.3, n.3, p.465-80, 2013

VIENNE, D.M.; GIRAUD, T.; GOUYON, P.H. Lineage selection and the maintenance of sex. **PLoS ONE**, 2013.

WIRSEL, S., B. HORWITZ, K. YAMAGUCHI, O. C. YODER, AND B. G. TURGEON. Single mating type-specific genes and their 3' UTRs control mating and fertility in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mol. Gen. Genet.**, v.259, p.272–281, 1998.

YUN, S. H., M. L. BERBEE, O. C. YODER, AND B. G. TURGEON. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.96, p.5592–5597, 1999.

CAPÍTULO 2 SIMULAÇÃO DE CONDIÇÕES AMBIENTAIS PARA A LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS DE *Phyllosticta citricarpa*

(SIMULATION OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS FOR *Phyllosticta citricarpa* ascospores RELEASE)

Ferreira-Maba; L.S.¹, Adamoski, D.; Serviensi; A.¹, Glienke; C.¹, Galli-Terasawa; L.V.¹, Kava-Cordeiro; V.¹

1.LabGeM, Laboratório de Genética de Microrganismos; Departamento de Genética, UFPR.

lisandragenetica@gmail.com

RESUMO

Os ascósporos, esporos da fase sexuada de *Phyllosticta citricarpa* desempenham um papel importante no ciclo da Mancha Preta dos Citros (MPC). As condições naturais que supostamente influenciam na produção e liberação destes esporos foram recriadas em laboratório com o desenvolvimento de caixas com temperatura, ventilação e umidade controlada. Plantas axênicas, com aproximadamente dois meses, foram plantadas em substrato específico para citros e tecidos contaminados com o fitopatógeno, coletados em áreas com alta incidência de MPC na região do Vale do Ribeira, no Paraná, foram depositados dentro da caixa. Acredita-se que tanto ascósporos quanto picnidiósporos sejam fonte de inóculo responsáveis pela MPC. As duas estruturas germinam na superfície de órgãos suscetíveis contribuindo para o aumento da doença nos pomares. Armadilhas caça-esporos foram colocadas dentro da caixa e avaliadas semanalmente. Não foram identificados ascósporos e picnidiósporos de *P. citricarpa*. Folhas das plantas cítricas foram desinfestadas superficialmente e deste tecido foi realizada a extração de DNA. Foi possível confirmar a colonização das plantas axênicas da caixa com folhas contaminadas pelo fitopatógeno, por *P. citricarpa* após PCR espécie-específica para este fungo. A caixa tratamento com fragmentos de casca de frutos com lesão, não gerou resultados positivos de amplificação pela PCR espécie-específica, o que confirma que frutos contaminados caídos no pomar não são capazes de infectar a planta cítrica.

Palavras chave: mecanismos de contaminação, dispersão de esporos, Mancha Preta dos Citros, ciclo biológico, *P.citricarpa*.

ABSTRACT

The ascospores, spores of *Phyllosticta citricarpa* sexual stage have an important role on the Citrus Black Spot (CBS) sexual cycle. Natural conditions that supposedly have some influence on the production and release of these spores were recreated in a laboratory with the development of boxes with controlled conditions of temperature, air and humidity. Two-month old axenic plants were planted in specific substrate for citrus and contaminated tissues with the phytopathogen, collected in areas with high incidence of CBS in Vale do Ribeira region, Parana state, were placed inside the box. It is believed that both the ascospores and the picnidiophores are a source of inoculum responsible for the CBS. Both structures germinate on the surface of susceptible organs contributing to the rise of the disease in fruit orchards. Spore traps were placed inside the box and held weekly. *P. citricarpa* ascospores and picnidiophores were not identified. Leaves of citrus trees were superficially sterilized and a DNA extraction was performed. It was possible to confirm the axenic plants colonization in the box contaminated with *P. citricarpa* after species-specific PCR for this fungus. The treatment box with peel fragments from fruits with lesions did not produce positive results through PCR which confirms that contaminated fallen fruit in the orchard are not capable of infecting the citrus plant.

Key words: contamination mechanisms, spores dispersion, Citrus Black Spot, biological cycle, *P.citricarpa*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MANCHA PRETA DOS CITROS (MPC)

Relatos da doença Mancha Preta dos Citros (MPC) foram descritos em 1895 na Austrália, ocasionando elevadas perdas na produção e pós-colheita de plantas cítricas, especialmente laranja. Por volta da década de 30, a enfermidade foi encontrada na região litorânea da província de Transvaal, tornando impróprios para a exportação mais de 90% dos frutos de pomares não protegidos (ROBBS, 1990). A MPC apresenta uma ampla distribuição geográfica, registrada na África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS; BITTENCOURT, 1995).

Em abril de 2010, a preocupação de citricultores do estado da Flórida, nos Estados Unidos da América, aumentou com a chegada da MPC em seus pomares e pelo reconhecimento por parte de governo. Alguns pesquisadores já verificaram que frutas da região estão infectadas com a doença e expressam preocupação com a falta de medidas eficientes para o controle da MPC (BOUFFARD, 2010).

Em decorrência da não existência da MPC no continente europeu, esta doença é classificada como quarentenária A1 para os países da União Européia, limitando significativamente a possibilidade de exportação de frutos *in natura* (SOUZA; GOES, 2010).

No Brasil, a primeira descrição da doença foi em 1940, em frutos coletados em Piracicaba, São Paulo. Em 1980 a doença ressurgiu no Rio de Janeiro e na década de 90 foi identificada atingindo o município de Conchal, uma importante região citrícola do Estado de São Paulo (GOES; FEICHTENBERGER, 1993). A disseminação da MPC ocorreu de forma muito rápida e encontra-se presente, de forma endêmica, em mais de quarenta municípios produtores do Estado de São Paulo (BALDASSARI *et al.*, 2001).

As medidas de controle da MPC em campo incluem a aplicação de fungicidas, a erradicação de plantas e frutos afetados e a proteção de pomares saudáveis, fatores que fazem parte do ciclo da doença (FUNDECITRUS, 2007)

(FIGURA 1). Sugere-se a eliminação dos frutos afetados antes do início da florada, suprimindo a principal fonte de inóculo representada pelos picnídios (ROBBS; BITTENCOURT, 1995). O controle químico com fungicidas, além de antieconômico, não é totalmente eficaz contra a doença. Porém, é necessário recorrer a este recurso quando a MPC ataca de forma severa e quando a produção destina-se ao consumo da fruta fresca (SPÓSITO, 1999). O principal problema da utilização sucessiva destes produtos é a seleção de linhagens resistentes, conforme observado na África do Sul (HERBERT; GRECH, 1985).

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, causador da MPC, foi capaz de crescer em meio de cultura mesmo após adição do fungicida estrobirulina na concentração de 10 µg/µL, apesar de apresentar uma redução na taxa de esporulação, quando comparada com linhagens cultivadas sem esse composto. Quando linhagens do fungo foram testadas com fungicida benomil, até uma concentração de apenas 0,5 µg/µL foi capaz de parar o crescimento micelial de 90% das colônias testadas (POSSIEDE *et al.*, 2009).

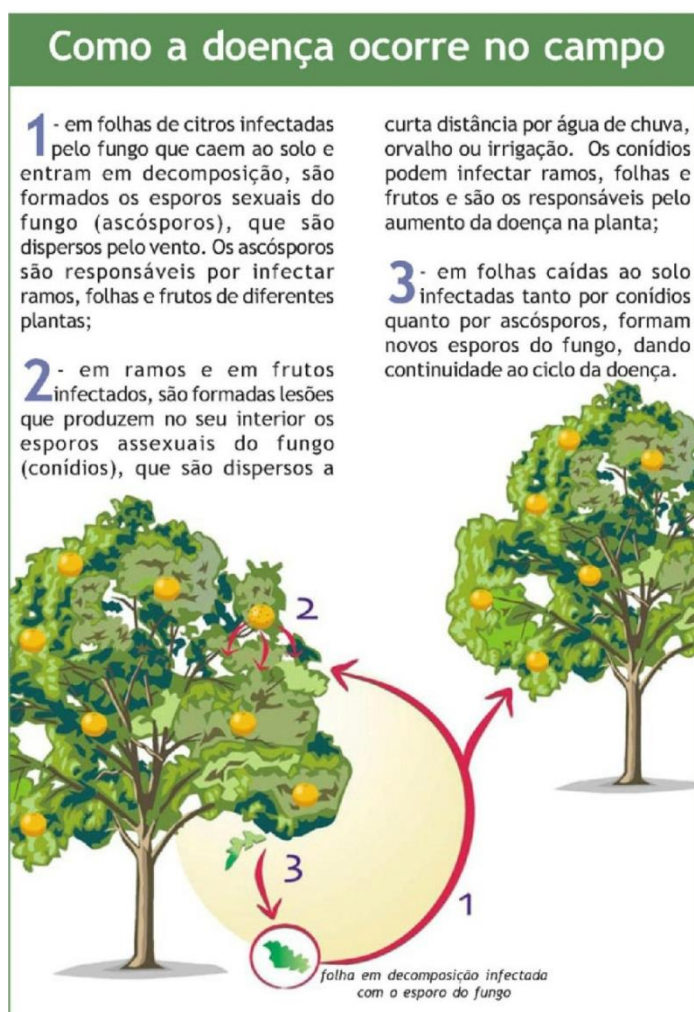


FIGURA 1: CICLO DA MANCHA PRETA DOS CITROS EM CAMPO

FONTE: Manual Técnico: Pinta Preta – Fundecitrus (2007)

1.2 O Gênero *Phyllosticta*

O gênero *Phyllosticta* foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz, e compreende as formas teleomórficas de espécies denominadas anteriormente de *Guignardia* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos mitospóricos geralmente saprófitos ou semiparasitas de folhas (SIVANESAN, 1984). O gênero sofreu uma reclassificação influenciada pela Declaração de Amsterdã de Nomenclatura Fúngica (HAWKSWORTH *et al.*, 2011), onde foi determinado que os fungos fossem nomeados com um único nome, não mais como era feito anteriormente quando utilizava-se uma nomenclatura para fase sexual e outra para a fase assexual.

Crous *et al.* (2006) realizaram análises filogenéticas comparativas de sequências de DNA, que influenciaram a mudanças na sistemática da família Botryosphaeriaceae. Então em 2012, Liu *et al.* mostrou um grupo distinto da família Botryosphaeriaceae, sugerindo a inclusão de *Phyllosticta* em uma nova família Phyllostictaceae. A nova família foi descrita baseada em análise morfológica e multigênica (SLIPPERS *et al.*, 2013; WIKKE *et al.*, 2013) e portanto, *Phyllosticta citricarpa* é considerada pertencente à família Phyllostictaceae.

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (PETRINI, 1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; GLIENKE, 1995;). No entanto, existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como cana-de-açúcar (PONS, 1990), eucalipto (CROUS *et al.*, 1993) e também frutíferas como abacate e tomate (BAKER, 1938), manga e mamão (McMILLAN, 1986), e, principalmente, em citros (McONIE, 1964; JOHNSTON; FULLERTON, 1988).

Características morfológicas e marcadores ou sequências de DNA vem sendo utilizados para diferenciar fungos isolados tanto de plantas cítricas saudáveis como sintomáticas para a MPC. Foi possível classificar os isolados, por marcadores RAPD, como pertencentes às espécies *Phyllosticta citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. spinarum* (STRINGARI *et al.*, 2009). O fato de haver alta similaridade genética entre indivíduos de *P. capitalensis* e um isolado patogênico de goiaba indica que a mesma espécie pode ser endofítica para um hospedeiro e patogênica para outro (STRINGARI *et al.*, 2009). O endófito de citros *P. capitalensis* A. J. Roy foi confundido por muitos anos com *Phyllosticta citricarpa* Kiely patógeno causador da Mancha Preta dos Citros (ROMÃO *et al.*, 2011).

O fungo *Phyllosticta citricarpa* Kiely possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso medindo 125 a 360 µm de diâmetro contendo um poro de 14 a 16 µm e paredes espessas com 20 a 22 µm. Seu asco apresenta forma de clava, arredondado na extremidade superior e é bitunicado. Contém oito ascósporos unicelulares, hialinos, ligeiramente cinzentos, rombóides,

contendo grânulos e um grande vacúolo central. Os ascósporos são cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades. Segundo Sivanesan (1984) pseudoparáfises são encontradas em pseudotécios maduros. De acordo com Johnston e Fullerton (1988), as formas anamorfias e teleomorfa geralmente são encontradas associadas.

A denominação das espécies em *Phyllosticta* é baseada principalmente no hospedeiro do qual o fungo foi isolado e em características morfológicas. Fungos do gênero *Phyllosticta* vêm sendo associados a várias doenças vegetais, inclusive à Mancha Preta de Citros. Linhagens deste gênero são isoladas do interior de tecidos de várias espécies de citros sem a MPC, ou seja, em plantas assintomáticas, sendo então denominadas de endofíticas. Com o avanço das técnicas de biologia molecular, vem sendo possível traçar um perfil mais preciso na caracterização destas espécies e várias classificações estão sendo revistas (VAN DER AA, 1973; SIVANESAM, 1984; PETRINI, 1986; LEUCHTMANN *et al.*, 1992;).

Glienke-Blanco *et al.* (2002), analisando a variabilidade genética de *P. citricarpa* isolada de citros observaram picnidiósporos, conidióforos, ascos jovens, ascósporos, hifas e outras estruturas através de microscopia óptica. Independentemente dos métodos utilizados para detecção dos microrganismos endofíticos, são importantes os cuidados que devem ser tomados durante o processo de isolamento, removendo a microbiota epifítica e outros contaminantes externos da superfície das folhas, pecíolos e sementes (MOORE-LANDECKER, 1996).

Existe uma diversidade enorme de microrganismos endofíticos presentes no interior de plantas saudáveis com grande potencial para serem estudados. No Brasil, exemplos desta diversidade podem ser encontrados nos trabalhos de Pereira, Azevedo e Petrini (1993); Glienke (1995); Araújo (2000); Azevedo (1998); Pimentel *et al.* (2001a); Pimentel *et al.* (2001b); Souza *et al.* (2004); Rubini *et al.* (2005).

A diversidade das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Uma ou duas espécies são predominantes

como endofíticas em um dado hospedeiro, enquanto outros isolados são pouco frequentes (ARNOLD *et al.* 2003).

Fialho (2004) avaliou *in vitro*, o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* como agentes no controle biológico contra *P. citricarpa*. Fialho *et al.*, (2010) demonstraram o potencial de produtos voláteis, produzidos por seis linhagens de *S. cerevisiae*, isolados de processos fermentativos na produção de etanol. As leveduras produziram em meio BDA compostos voláteis de ação fungistática capazes de inibir em até 87% o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da MPC.

Dados moleculares fornecem informações para que vários autores revisem a classificação de espécies do gênero *Phyllosticta*. Estes dados também vêm sendo utilizados para demonstrar o grande grau de variabilidade genética intraespecífica. Blanco (1999) e Christo (2002) observaram esta variabilidade entre linhagens isoladas de lesão de Mancha Preta de Citros (MPC), ou seja, linhagens de *P. citricarpa*, utilizando dados de RAPD. Esta variabilidade também foi evidenciada em linhagens isoladas em plantas assintomáticas, até recentemente descritas como *Guignardia mangiferae* (GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; CHRISTO, 2002; BAAYEN *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2004) e atualmente denominada *Phyllosticta capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2011).

Em 1999, Blanco comparou geneticamente, por meio de marcadores de RAPD, linhagens de populações patogênicas e endofíticas de *Phyllosticta* spp. de diversas regiões e hospedeiros. Constatou-se a existência de três populações de *Phyllosticta* geneticamente muito diferentes coexistindo em citros, sendo duas endofíticas e uma patogênica, sugerindo que talvez estas três populações pudessem pertencer a espécies distintas. O desenvolvimento de um par de oligonucleotídeo iniciador capaz de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para distinção genética entre estes grupos (STRINGARI *et al.*, 2009).

Utilizando linhagens referência e sequenciamento de genes como GPDH, da região ITS1, 5.8S, ITS2, TEF1 e ACT, Glienke *et al.* (2011) propõem que *Phyllosticta mangiferae* é um táxon distinto de *P. capitalensis*.

A espécie *Phyllosticta mangiferae* foi descrita na literatura como sendo o agente causal de necrose em folhas de manga (MENEZES; OLIVEIRA, 1993), apresentando características morfológicas extremamente semelhantes às observadas em *G. citricarpa*, o que tem dificultado a identificação de frutos e folhas livres da MPC. Stringari (2009), utilizando características morfológicas e dados moleculares de marcadores RAPD e sequenciamento da região ITS1 e ITS2 rDNA, analisou a variabilidade genética entre linhagens patogênicas de *P. citricarpa* (isoladas de lesões da MPC) e linhagens endofíticas de *Phyllosticta* sp e *G. mangiferae* (isoladas de folhas assintomáticas) de diversas regiões e hospedeiros (citros, erva-mate, goiabeira e mangueira). A alta similaridade genética entre os isolados endofíticos, sugeriu a identificação como *G. mangiferae* (Anamorfo: *Phyllosticta capitalensis*), corroborando com os estudos anteriores, onde foram utilizados como ferramenta marcadores RAPD (CHRISTO, 2002), sequências ITS e dados de AFLP (BAAYEN *et al.*, 2002).

1.3 LIBERAÇÃO DE ASCÓSPOROS EM LABORATÓRIO

Em sua revisão sobre a epidemiologia da Podridão Negra da Videira, causada pelo fungo *Phyllosticta ampellicida* (teleomorfo - *Guignardia bidwellii*), Molitor e Beyer (2014) citam publicações que observaram a liberação de ascósporos em início de períodos de chuva, nenhum ascósporos observado em um túnel de vento a 2°C, mas os esporos sexuais foram liberados quantitativamente num período de 3h após o aumento da temperatura para 20°C e uma taxa maior de liberação de ascósporos em época de floração.

Reis *et al.* (2003) descreveram condições para obtenção de ascósporos de *Phyllosticta citricarpa* com 21 dias de incubação. Relacionaram também o efeito da temperatura e do tempo de incubação na germinação dos ascósporos. Observou-se também produção de pseudotécios a 27 °C em fotoperíodo 12/12 h. Em 2006, Reis *et al.* avaliaram a produção de ascósporos, pela *Phyllosticta citricarpa*, dependente de temperatura, molhamento foliar e precipitação de chuva, utilizando uma armadilha caça esporos em pomares de Mogi Guaçu, no estado de São Paulo, onde a produção de ascósporos atingiu

um pico em janeiro e fevereiro. Houve uma forte relação entre a gravidade da doença e a precipitação total.

Prussin *et al.* (2014) publicaram um estudo sobre a liberação de ascósporos pelo fungo *Fusarium graminearum*, agente causal da giberela, doença que ataca o trigo e a cevada e a cevada. O microrganismo produz esporos que podem ser transportados por longas distâncias. Com o objetivo de prever produção, liberação e transporte dos ascósporos foram realizados alguns experimentos em laboratório e no campo. Os resultados indicaram que os esporos sexuais foram liberados durante predominantemente à noite, dado importante para o entendimento do ciclo de vida do fungo.

Alves e Beresford (2013) publicaram um estudo sobre o fungo *V.inaequalis*, agente causal da Mancha Preta da Maçã onde afirmam que os ascósporos constituem a principal fonte de inóculo.

Estudos sobre o desenvolvimento de doenças de interesse econômico como a MPC, Mancha Preta da Maçã e a Podridão Negra da Videira, são essenciais para o melhor entendimento do ciclo de desenvolvimento do agente causal fornecendo dados para novos protocolos visando o controle biológico. Assim este trabalho teve como objetivo simular em laboratório as condições existentes no campo de plantações de citros, às quais são atribuídas a produção e dispersão dos ascósporos de *P. citricarpa*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento foram construídas três caixas com vento, umidade e fotoperíodo controlados (FIGURA 2).

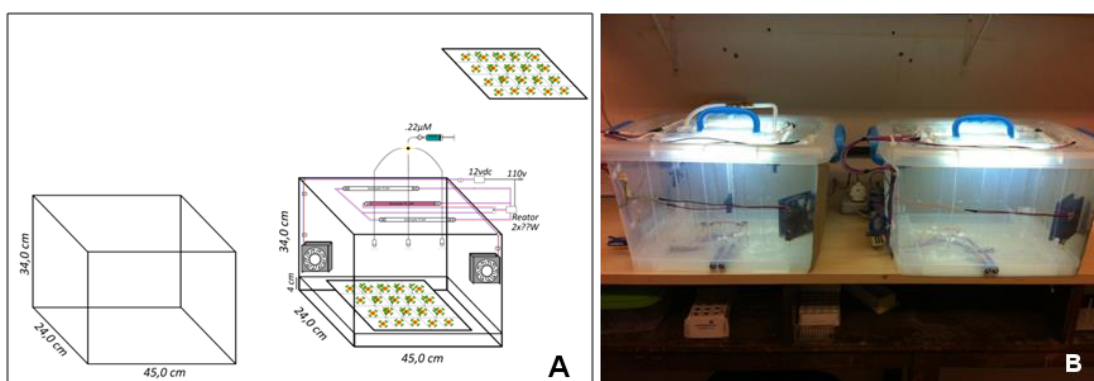


FIGURA 2 – PROJETO DA CAIXA PARA O EXPERIMENTO QUE SIMULA AS CONDIÇÕES DE CAMPO (A). IMAGEM REAL (B).

FONTE: Douglas Adamoski Meira (2012)

Em cada caixa foram colocados 6 cm de substrato próprio para cultivo de citros, autoclavado e seco 5 vezes. Em uma das caixas tratamento foram plantadas 12 plântulas axênicas desenvolvidas segundo Bessalho *et al.* (2001), folhas de citros cobrindo o substrato e 20 fragmentos de casca de laranja com lesão, contendo picnídios, conforme e na outra caixa somente folhas secas como relacionado na Figura 3. Na caixa controle, não foram colocados os fragmentos de casca de laranja nem folhas do campo. Também foram instaladas armadilhas caça-esporos para a coleta de ascósporos de *Phyllosticta citricarpa*. Estas armadilhas foram desenvolvidas em lâminas de vidro contendo uma fina camada de silicone previamente testado, para este fim, no IVIA (Instituto Valenciano de Invetigações Agrárias). Todas as plantas dos tratamentos foram retiradas para isolamento de endofíticos e extração de DNA com Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit, MoBio® após 18 meses de experimento.



FIGURA 3 - FOTOS REAIS DAS CAIXAS. A e B: CONTROLE COM APENAS FOLHAS E PLÂNTULAS AXÊNICAS. C e D: TRATAMENTO COM FRAGMENTOS DE CASCA DE LARANJA DOCE COM LESÃO E: TRATAMENTO COM FOLHAS SECAS DO CAMPO
FONTE: A autora (2014).

Para o isolamento foi realizada a desinfestação dos tecidos para remoção de microrganismos epifíticos, conforme sugerido por Petrini (1992) (com adaptações). As folhas foram lavadas, e submetidas a banho de etanol 70% por 1', hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo) por 3', etanol 70% por 30" e água destilada autoclavada por 6', consecutivamente. 100 μ L desta água foi colocada em placa com meio BDA para atestar a eficiência da desinfestação. Após a desinfestação, as folhas foram fragmentadas e transferidas para placas de isolamento, então acondicionados em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo 12/12h.

Visando a detecção do patógeno nas plantas axênicas, foi utilizada PCR e regiões de detecção previamente conhecidas para *P. citricarpa*. A reação de PCR espécie-específica foi realizada pela amplificação do fragmento genômico GCP(300pb), amplificado pelos *primers* GCP1(5'AAGTGTGAGTGTCTGAAGGTGG 3') GCP2(5'GACGACTCGCTTTTCTACGGC3') (STRINGARI *et al.*, 2009), cuja detecção caracteriza a presença de *P. citricarpa*.

Foi realizada a amplificação em uma reação contendo Tampão 1X de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,3μM de cada *primer* e 0,8U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 20μL e 10ng de DNA molde. Os ciclos utilizados foram 94°C por 4 minutos, seguido de dois conjuntos de amplificação: um primeiro, de 15 ciclos com 30 segundos a 94°C, 2 segundos (aumentando 2 segundos a cada passo do ciclo) na temperatura de anelamento do *primer* e 16 segundos (aumentando 1 segundo a cada passo do ciclo) a 72°C; e um segundo, de 25 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e 30 segundos a 72°C. Ao fim, um ciclo único de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e uma extensão final de 4 minutos a 72°C (ADAMOSKI *et al.*, 2011). A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5%.

As três caixas foram avaliadas periodicamente durante os 18 meses de experimento, considerando a extração do DNA da planta, as armadilhas caça esporos e isolamento de endofíticos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Spósito *et al.* (2004) para a MPC existe dupla fonte de inóculo responsáveis pela doença, os ascósporos, formados em pseudotécios em folhas caídas e em decomposição e, os picnidiósporos que são formados nas lesões existentes nos frutos, em folhas ainda aderidas nas plantas e em ramos secos. Tanto os ascósporos como os picnidiósporos germinam na superfície de órgãos suscetíveis contribuindo para o aumento da doença nos pomares. Confirmando parte dessa teoria, foi possível verificar a colonização das plantas

axênicas por meio de PCR espécie-específica (FIGURA 4) a partir de amostras obtidas da caixa que continham folhas em decomposição provenientes do campo. Os ascósporos são formados em folhas em decomposição, cujo tempo de formação depende das condições climáticas, variando de 40 a 180 dias após a queda da folha (KOTZÉ, 1981). Sua produção é influenciada pela alternância entre os períodos seco e úmido. Considerando a sua morfologia, ascósporos são muitas vezes carregados pelo vento, disseminando *Phyllosticta citricarpa* a curtas e longas distâncias (TIMMER, 1999).

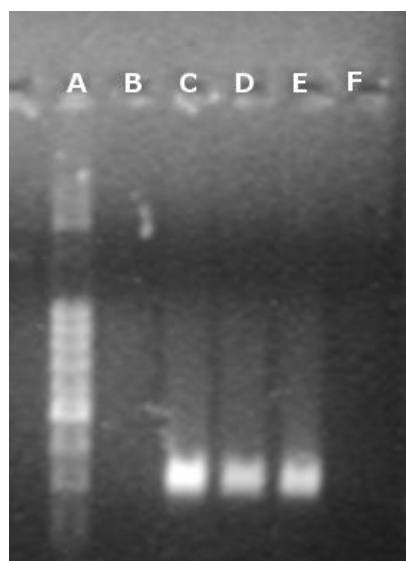


FIGURA 4 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO GCP EM GEL DE AGAROSE 1,5%. A: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *Ladder* de 100pb. B: CONTROLE NEGATIVO (*P.captalensis*). C: CONTROLE POSITIVO DE AMPLIFICAÇÃO - LGMF06. D e E AMOSTRAS RETIRADAS DA CAIXA COM FOLHAS DO CAMPO. F: AMOSTRA RETIRADA DA CAIXA COM FRAGMENTOS DE CASCA DE FRUTOS COM LESÃO.

FONTE: A autora (2014).

NOTA: A banda esperada tem 300pb. O controle positivo LGMF 06 corresponde a um isolado de *Phyllosticta citricarpa*

Admite-se que, alguns sintomas, devido à individualização das lesões, estejam relacionados às infecções originárias de ascósporos, já que esses podem ser levados pelo vento e dessa forma serem espalhados aleatoriamente. Outros tipos de sintomas, em razão do baixo nível de individualização das lesões, pressupõem-se que sejam originários de conídios, já que os mesmos, embora possam ser espalhados na superfície dos frutos, na maioria das vezes apresentam-se concentrados dada a sua remoção através da mucilagem (SILVA-PINHATI *et al.*, 2009).

MCONIE (1967) já citava que não havia um método apropriada para a obtenção dos ascósporos de forma seletiva. Lemir *et al.* (2000) propôs que a inoculação utilizando suspensão de ascósporos seria em princípio a mais promissora, porém, dada a dificuldade da obtenção dessas estruturas em laboratório, sua utilização é muito limitada. Em nenhum dos caça esporo instalados foi possível capturar os esporos sexuais, mostrando a dificuldade de se ter amostra dessas estruturas.

A caixa tratamento com fragmentos de casca de frutos com lesão não gerou resultados positivos de amplificação pela PCR espécie-específica, o que teria como suporte a citação de Truter *et al.*, (2007) que expôs dados mostrando que frutos caídos no pomar não foram capazes de infectar folhas nos pomares.

A detecção de *P.citricarpa* por meio de isolamento de endofíticos não foi possível em nenhuma das coletas feitas.

4 CONCLUSÕES

Com relação aos dados obtidos nestas condições é possível indicar que folhas secas em decomposição, são fonte de inóculo de ascósporo da Mancha Preta dos Citros em plantas sadias. Fato importante do ponto de vista agrônomo, indicando a necessidade constante de manejo de resíduos no campo

As cascas contendo lesão com picnídios não foram capazes de gerar uma amplificação positiva por PCR espécie-específica, mostrando que provavelmente, cascas de frutos contaminados caídos no solo dos pomares não são fonte de inóculo de *P. citricarpa*.

Este experimento necessita de novas repetições em ambientes maiores, para que essas hipóteses sejam confirmadas.

REFERÊNCIAS

ADAMOSKI, D.; STRINGARI, DANYELLE; FABRIS, JULIANA; et al. Desenvolvimento de uma metodologia eficiente para detecção molecular do fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. Suplemento, p. 173–173, 2011.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archive of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447- 457, 2000.

ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.117-137, 1998

BALDASSARI, R. B.; GOES, A.; SANTOS, J. M.; TIMOSSO, A. J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Phyllosticta citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The occurrence of latent infections in developing fruits. **Annals of Botany**, London, v.2, p. 919-931, 1938.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER AA, H.A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; SCHUTTE, G.C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Phyllosticta citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n. 5, p. 464-477, 2002.

BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; HISSANO, Z.; VIEIRA, L. G. E. In Vitro Adventitious Shoot Regeneration from Sweet Orange Using Thin Epicotyl Sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 27–34, 2001.

BLANCO, C.G. ***Phyllosticta citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**. 196p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

BOUFFARD, K. (2010). *New threat for Florida citrus: black spot*. Acesso em junho de 2010, disponível em <http://www.heraldtribune.com/article/20100407/BREAKING/100409694>

CHRISTO, D. **Variabilidade genética e diferenciação molecular de isolados endofíticos e patogênicos de *Phyllosticta* spp e *Phyllosticta* sp.** 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2002.

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucalyptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, p. 582-584, 1993.

CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O.; PHILIPS, A.J.L *et al.* Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies In Mycology**, v.55, p.235–253, 2006.

FIALHO, M. B. **Efeito *in vitro* *Sacharomyces cerevicea* sobre *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros.** 60 f. Dissertações (Mestrado) – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

FIALHO, M.B.; TOFFANO, L.; PEDROSO, M.P.; AUGUSTO, F. & PASCHOLATI, S.F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Phyllosticta citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.26, p.925 – 32, 2010.

FUNDECITRUS. Manual de pinta preta. Araraquara: Fundo Paulista de Defesa da Citricultura, 2007. 7p. (Boletim Técnico).

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD.** 115 f. Dissertações (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Phyllosticta citricarpa* isolated from *citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.251- 255, 2002.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R.G.; GROENEWALD,

J.Z.; CROUS, P.W.; Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia** 26, 2011.

GOES, A.; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp.) VAN DER AA (*Phyllosticta citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 138, 1993

HAWKSWORTH, D.L.; CROUS, P.W.; REDHEAD, S.A.; REYNOLDS, D.R.; SAMSON, R.A., *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**, v.2, p.105-112, 2011.

HERBERT, J.A., GRECH, N.M. A strain of *Phyllosticta citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to benomyl in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1007, 1985.

JOHNSTON, P.R.; FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov., cause of a citrus leal spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-163, 1988.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981.

LEMIR, A.H.M.; STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H.; CANTON, N.V. In vitro production of ascospores and pathogenicity of *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.374-376, 2000.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n. 4, p. 287-294, 1992.

LIU, J.K., PHOOKAMSAK, R., DOILOM, M. *et al.* Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. **Fungal Diversity**, v.57, p.149-210, 2012.

McMILLAN JR., R.T. *Phyllosticta citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.117, p. 260-264, 1986.

McONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Phyllosticta* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.40-43, 1964.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to control of black spot. **Phytopathology**, v.57, p.743-746, 1967.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. Recife, p.146-149, 1993.

MOLITOR, D; BEYER, M. Epidemiology, identification and disease management of grape black rot and potentially useful metabolites of black rot pathogens for industrial applications - a review.

Ann Appl Biol. n.3, v.165, p.305-317, 2004.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. p. 501-513.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Eds.), **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge: Cambridge University, p.175-187, 1986.

PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L. & VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A. M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos do Milho (*Zea mays* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais** .Foz do Iguaçu, 2001a. p. 24.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; PIMENTEL, A.M.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos da Soja (*Glycine Max* L.) e busca de possíveis entomopatógenos no controle de pragas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais** .Foz do Iguaçu, 2001b. p. 28.

PONS, A.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. Xanthan batch fermentations: Compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. **Bioprocess Engineering**, v. 5, p.107-114, 1990.

POSSIEDE, Y.M., GABARDO, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.V., AZEVEDO, J.L., GLIENKE, C. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Phyllosticta citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 308-313, 2009.

PRUSSIN, A.J.; SZANYI, N.A.; WELLING, P.I.; ROSS, S.D.; SCHMALE, D.G. Estimating the production and release of ascospores from a field-scale source of *Fusarium graminearum* inoculum. **Plant Disease**, v.98, p. 497–503, 2014.

REIS, R.F.; GOES, A.; PEREIRA, G.T. Efeito da aplicação de oxícloreto de cobre em diferentes épocas no controle da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v.29, p.12-18, 2003.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatol. bras**, v.31, n.1, p. 29-34, 2006.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

ROMÃO, A.S.; SPÓSITO, M.B.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO J.L.; ARAÚJO, W.L. Enzymatic differences between the endophyte *Phyllosticta mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. **Genetics and Molecular Biology**, v.10, p.243-252, 2011.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cação (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biology Science**, Cambridge, v. 1, p. 24-33, 2005.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2009.

SIVANESAM, A. **The bitunicate Ascomycetes and their anamorphus**. Berlin: J. Cramer, 701p, 1984.

SLIPPERS, B.; BOISSIN, E.; PHILLIPS, A. J. L.; GROENEWALD, J. Z. *et al.* Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; SPARTACO, A. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos

endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, Manaus, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

SOUSA, P. F. C. and GOES, A. Reação de laranjeiras-doces quanto à resistência a *Phyllosticta citricarpa*. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online], v. 32, p. 718-725, 2010.

SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.;MORAES. M. R.; FEICHTENBERGER, E.; RUBIM, C.A. Avaliação de tratamentos fungicidas da mancha preta em frutos de laranja 'Natal'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p. 334, 1999.

SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R.B.; AQUINO, R. de. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.1, p.81-85, 2004.

STRINGARI, D., GLIENKE, C., CHRISTO, D., MACCHERONI JR., WALTER, AZEVEDO, J.L., High molecular diversity of the fungus *Phyllosticta citricarpa* and *Phyllosticta mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, 1063-1073, 2009.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. Compendium of citrus diseases. 2 ed St Paul: **APS Press**. 2000, 92p.

TRUTER, M.; LABUSCHAGNE, P. M.; KOTZÉ, J. M.; MEYER, L.; KORSTEN, L.; Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. Australasian. **Plant. Pathol.**, v. 36, p. 87-93, 2007.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Oxford, n.5, 1973.

WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKOON, R.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaeriales*). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1-29, 2013.

CAPITULO 3 - TERPENOS CÍTRICOS INFLUENCIAM O FUNGO *Phyllosticta citricarpa*, CAUSADOR DA MANCHA PRETA DOS CITROS.

(Citrus terpenes influence the fungus *Phyllosticta citricarpa*, the Citrus Black Spot pathogen.)

Ferreira-Maba; L.S¹; Linchuca, LC¹; Rodríguez, A²; Peña, L²; Glienke, C¹; Galli-Terasawa, LV¹; Kava-Cordeiro ¹,

¹ Departamento de Genética, UFPR, CEP 81531-980, Curitiba, PR;

² IVIA, Espanha.

E-mail: lisandragenetica@gmail.com

RESUMO

A Mancha Preta dos Citros é uma doença causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. É encontrada em inúmeros países da África, Ásia, Oceania, América do Sul e recentemente nos Estados Unidos. Sua transmissão ocorre por meio da disseminação dos esporos colonizando frutos, folhas e ramos secos causando lesões, depreciando os frutos levando a reprovação por parte do mercado consumidor. Alternativas para o controle desta e outras doenças são alvos de pesquisa em vários países onde a cultura de citros tem grande importância econômica, como no Brasil. Óleos voláteis presentes em cascas de citros desempenham diversas funções nos frutos e estudos recentes têm indicado que alterações na composição desses óleos afetam a ação de microrganismos fitopatogênicos, incluindo o fungo *P. citricarpa*. Foi avaliada a relação entre o crescimento e produção de picnícios frente aos principais terpenos produzidos na casca dos frutos cítricos e que exercem um papel no processo de atração de pragas e patógenos. Foi possível observar a ação estimulatória dos terpenos limoneno e cariofileno com relação ao crescimento e produção de picnídios. Os terpenos citrionelol, nerol, linalol inibiram a produção de picnídios e crescimento do fungo sendo o último apresentou a maior ação inibitória, sendo um possível agente fitossanitário natural. O estudo da resposta deste fitopatógeno a estes terpenos voláteis é um importante passo no estudo da interação deste fungo com seu hospedeiro e poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da MPC.

Palavras chave: Compostos orgânicos voláteis, terpenos, limoneno, Controle alternativo, interação planta-patógeno.

ABSTRACT

Citrus Black Spot is a disease caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*. It is found in many countries in Africa, Asia, Oceania, South America and recently in the United States. Its transmission occurs through spores which colonize a fruit, dry its leaves and branches causing injury which leads to the depreciation of the fruits leading to consumer market disapproval. Alternatives to control this and other diseases are research targets in several countries where the citrus crop has great economic importance, as in Brazil. Volatile oils present in citrus peels perform several functions in fruits and recent studies have indicated that changes in the composition of these oils affect the pathogenic microorganisms action, including the fungus *P. citricarpa*. It was evaluated the relationship between growth and production of pycnidia against the main terpenes produced in the peel of citrus fruits which play a role in the attraction of pests and pathogens. It was possible to observe the stimulatory action of terpenes limonene and caryophyllene regarding the growth and production of pycnidia. The terpenes citronellal, nerol, linalool inhibit the production of conidia and fungal growth. The last one had the highest inhibitory activity, and it is a possible natural phytosanitary agent. The study of this pathogen response to these volatile terpenes is an important step in the study of the interaction of this fungus with its host and can contribute to the development of new strategies to control the CBS.

Key words: volatile organic compounds, terpenes, limonene, alternative control, plant-pathogen interaction.

1 INTRODUÇÃO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma importante doença causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. Os sintomas ocasionados pela doença apenas depreciam os frutos para comercialização, não interferindo na sua qualidade interna. O principal problema encontrado com a presença da doença é o impedimento de exportação do produto para o continente Europeu. Nessa região não se encontra registro dessa patologia, onde existe uma barreira sanitária para entrada de frutos brasileiros nessa área, gerando um prejuízo para produtores.

O controle da MPC está baseado na utilização de fungicidas. No Brasil, a MPC vem sendo controlada, principalmente, através do controle químico sistemático, e inúmeras pulverizações com fungicidas específicos são realizadas (4-5 aplicações/ano). Por isso, fica evidente a necessidade de se obter novas alternativas de controle que possam colaborar com o sistema de produção atual (ROSSETO, 2011).

A casca da laranja é caracterizada por duas partes: o exocarpo (flavedo) constituído pela epiderme e por uma camada de células glandulares de óleo onde são encontrados óleos essenciais. Já em 1964, Tobshy e Sinclair descreveram que extratos de flavedo e albedo ocorria a inibição do desenvolvimento fúngico. Estudos recentes têm indicado que alterações na composição dos óleos voláteis presentes na casca de citros tem afetado o desenvolvimento do fungo sobre o fruto (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2012), sendo necessária a avaliação individual desses compostos para determinar sua efetividade.

Metabólitos secundários são comuns em plantas e também em fungos (HALL, 2006), participam da estrutura, defesa contra predadores e interações interespecíficas (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). São moléculas que geralmente não estão envolvidas em funções vitais e possuem características básicas muito variadas (HALL, 2006). Segundo Rodrigues *et al.* (2013) existem poucas evidências sobre a função primária de metabólitos secundários em frutos carnosos, mas é amplamente assumido que eles estão envolvidos na mediação de dois objetivos principais: atrair organismos de dispersão de sementes; e evitar

o consumo por predadores de sementes, mas que a principal função em frutos imaturos seria para defesa contra todos os tipos de consumidores potenciais. Outras hipóteses, como benefícios nutricionais, atração / associação, inibição da germinação de sementes já foram propostas (CIPOLLINI, 2000).

Traços do fruto são percebidas por animais. O aroma e cor são, provavelmente, as primeiras pistas para a atração (SCHAEFER, 2011; VALIDO *et al.*, 2011). No entanto, o papel dos voláteis de frutos maduros como sinais olfativos voltados para dispersores e predadores legítimos, tem sido pouco investigado.

Compostos orgânicos voláteis (COVs), incluem uma vasta diversidade de metabólitos secundários de baixo peso molecular. Enquanto alguns COVs são, provavelmente, comuns a quase todas as plantas, outros são específicos para apenas um ou alguns táxons relacionados. Para entender o significado funcional de compostos orgânicos voláteis em frutos maduros, é necessário conhecer a sua biossíntese e regulação do desenvolvimento, a sua acumulação quantitativa e qualitativa e as respostas desencadeadas por COVs (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Yuan *et al.* (2008) descreveram terpenos com atividade contra os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, mostrando a importância de maiores análises destes compostos para o controle biológico. Sharma e Thripathi (2008), mostraram a ação de óleos essenciais de *Citrus sinensis* no controle de crescimento e morfogênese de *Aspergillus niger*, após sete dias de incubação. Neste estudo, o óleo essencial de epicarpo de *C. sinensis* foi usado para analisar alterações morfológicas de *A. niger*, a fim de investigar seu modo de ação. Resultados como estes indicam a possibilidade de explorar os óleos essenciais de *Citrus sinensis* como inibidores fúngicos.

Experimentos realizados utilizando laranjas geneticamente modificadas (*Citrus sinensis*) com alteração (*down-regulation*) no gene CitMTSE1 (limoneno sintetase) e consequente diminuição da produção de limoneno, o terpeno mais abundante em laranja doce, mostraram que a ação de algumas espécies de fungos e a atração de insetos foi diminuída. Estes experimentos comprovam que os terpenos presentes nos óleos essenciais de citros estão relacionados com

diversas funções como ação de defesa contra patógenos, atração de animais para dispersão das sementes e atração de polinizadores (RODRÍGUEZ *et al.*, 2011).

Ainda segundo Rodriguez *et al.* (2011) a modificação no gene CitMTSE1 que causa uma diminuição da produção de limoneno, ocasiona como efeito colateral um aumento da produção de nerol e citronelol. Esse aumento se deve à síntese de terpenos originados a partir de um composto em comum. Logo, com a inibição da produção de um desses voláteis, ocorre uma maior disponibilidade deste composto um aumento das outras vias de produção de terpenos.

Nerol é um álcool do tipo monoterpeno (classe de substâncias naturais, ou metabólitos secundários de origem vegetal, especialmente das coníferas. Tem fórmula química geral $(C_5H_8)_n$ e é encontrado em muito dos óleos essenciais como da erva-cidreira. Ele foi originalmente isolado do Óleo de néroli, de onde veio seu nome, é um líquido incolor que possui aroma de rosa doce, sendo largamente usado na perfumaria (FAHLBUSCH, 2003).

Limoneno é um hidrocarboneto cíclico insaturado, sendo um líquido incolor e volátil, encontrado naturalmente nas cascas de frutas cítricas, sendo responsável pelo seu odor característico. Possui a fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, possui um centro quiral e é relativamente estável (AZAMBUJA, 2013).

Citronelol é um dos componentes do óleo essencial de algumas plantas medicinais utilizadas na medicina popular, como o *Cymbopogon citratus* e a *Lippia alba*, sendo pertencente a uma família de produtos naturais provenientes de unidades de isopreno C5. Alguns efeitos farmacológicos tais como: antibacteriano, antifúngico, anti-espasmódico e anticonvulsivante já foram descritos para citronelol (BASTOS *et al.*, 2010).

Linalol é um monoterpeno oxigenado presente no óleo de várias plantas e frutas, como citros, manjerição, lavanda (FISHER; PHILLIPS, 2008; KRIST *et al.*, 2008). KOTAN *et al.* (2007) descreveram uma bioatividade do linalol contra diversas bactérias, com inibição de crescimento.

Beta-cariofileno é um constituinte importante em várias espécies de óleos essenciais de plantas medicinais usadas na medicina popular do Brasil. Pertence à classe química dos sesquiterpenos e tem sido submetido a vários

estudos. Pode ser empregado na medicina tradicional como medicamento com ação antiinflamatória, antitumoral, bactericida, insetífugo e espasmolítico (CARNEIRO *et al.*, 2010).

O estudo da resposta deste fitopatógeno a estes terpenos voláteis é um importante passo no estudo da interação deste patógeno com seu hospedeiro e poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da MPC.

2 MATERIAL BIOLÓGICO E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem selvagem LGMF06, correspondente à *Phyllosticta citricarpa* pertencente à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. A linhagem LGMF06, foi isolada de lesões da Mancha Preta dos Citros no Estado de São Paulo (BR) e apresenta teste de patogenicidade positivo (BALDASSARI *et. al.*, 2008).

2.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa*.

Os métodos utilizados nos experimentos estão descritos no Quadro 1. Quando a diluição dos terpenos foi necessária esta foi realizada em água ultrapura autoclavada. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006). Todas as placas dos experimentos foram incubadas a 24°C sob luz constante. A quantidade de terpenos utilizada foi previamente determinada pelo Instituto Valenciano de Invetigações Agrárias - IVIA.

Experimentos	Meio de cultura	Voláteis	Quantidade	Observações	Tempo de avaliação
Exposição de <i>P.citricarpa</i> a terpenos voláteis	BDA (Batata-Dextrose-Ágar) pH 5,8	Limoneno Citronelol Nerol	10 µL	Placa de Petri com divisória; papel filtro; disco de micélio de 5 mm de diâmetro e 10 dias de crescimento	8; 16; 22; 30 DIAS
	BDA pH 5,8	Limoneno Citronelol Nerol B- cariofileno Linalol	5 µL		8; 15; 22; 30 DIAS
	BDA pH 5,8	Limoneno Citronelol Nerol B- cariofileno Linalol	5 µL	Placa de Petri com divisória; vidro de relógio; disco de micélio de 5 mm de diâmetro e 10 dias de crescimento	7; 14; 21 DIAS
Suplementação do meio de cultura com terpenos cítricos	MEA (Malt Extrac Agar)	LARANJA DOCE		Placa de Petri sem divisória; voláteis misturados adicionados ao meio de cultura; disco de micélio com 5 mm de diâmetro e 10 dias de crescimento	7; 14; 21 DIAS (registro de dados a cada 7 dias)
		Limoneno Citronelol Nerol LARANJA TRANSGÊNICA Limoneno Citronelol Nerol	25 µL 0,004 µL 0,0023 µL 0,5 µL 0,04 µL 0,05 µL		

QUADRO 1 - DESCRIÇÃO DAS CONDIÇÕES DAS AVALIAÇÕES SOBRE A INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *P.citricarpa*.
FONTE: A autora (2014).

2.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa*

O método utilizado na avaliação da produção de picnídios foi o utilizado por Baldassari *et al.* (2009) e está descrita no Quadro 2. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006). Todas as placas dos experimentos foram incubadas a 24°C sob luz constante.

Experimentos	Meio de cultura	Voláteis	Quantidade	Observações	Tempo de avaliação
Método segundo Baldassari <i>et al.</i> (2009)	Ágar água	Limoneno	10 µL	Placa de Petri com divisória; papel filtro; disco de micélio de 5 mm de diâmetro e 14 dias de crescimento	15; 21 e 28 dias
		Citronelol Nerol			
		Limoneno	5 µL	Placa de Petri com divisória; papel filtro; disco de micélio de 5 mm de diâmetro e 14 dias de crescimento	14 e 21 dias
		Citronelol Nerol B- cariofileno Linalol			

QUADRO 2- DESCRIÇÃO DAS AVALIAÇÕES DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa*

NOTA: o método descrito por Baldassari *et al.* (2009) inclui nas placas discos de folha de *Citrus cinensis* autoclavados de 10 mm de diâmetro.

FONTE: A autora (2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa* - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizadas análises dos dados obtidos pelos experimentos de avaliação da influência dos terpenos com relação ao crescimento de *P. citricarpa* e obtidos valores médios descritos na Tabela 1.

Exposição de P.citricarpa a terpenos voláteis		Nerol	Limoneno	Citronelol	Controle		
	8º dia	0,784	1,074	0,808	1,068		
	15º dia	1,489	2,03	1,4	2,351		
	22º dia	2,362	4,503	2,159	4,327		
	30º dia	4,907	7,076	3,405	7,305		
		Nerol	Limoneno	Citronelol	Controle		
	8º dia	0,367	2,349	0,313	1,926		
	15º dia	0,635	5,55	0,474	4,507		
	22º dia	1,435	14,387	1,041	13,787		
	30º dia	2,613	16,298	1,671	16,75		
		Nerol	Limoneno	Citronelol	Cariofileno	Controle	
	7º dia	0,772	0,81	0,566	1,298	1,017	
	14º dia	1,557	1,472	1,027	2,907	2,373	
	21º dia	2,664	2,717	1,647	4,291	3,607	
		Nerol	Cariofileno	Citronelol	Limoneno	Linalol	Controle
	7º dia	1,088	2,759	1,011	1,428	0,791	1,7
	14º dia	1,837	3,519	2,203	2,229	1,43	2,652
	21º dia	2,539	3,978	2,597	2,903	1,73	3,338
Suplementação do meio de cultura com terpenos cítricos		L. doce	L.Transgênica	Controle			
	7º dia	3,953	2,458	2,811			
	14º dia	8,933	3,983	4,191			
	21º dia	14,032	5,802	6,358			

TABELA 1 - RESULTADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *P. citricarpa*

NOTA: Os valores médios foram obtidos pelo programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006)

A Tabela 2 mostra valores percentuais da influencia dos terpenos no crescimento do fitopatógeno, obtidos pela fórmula: $Y = 100 - [\text{valor médio Tratamento} / \text{valor médio Controle}] \times 100$, onde 0 e 100 indicam que ocorreu inibição. Valores menores que zero (negativos) indicam crescimento da *P.citricarpa*, ou seja, houve crescimento do fitopatógeno. Valores médios foram obtidos a partir dos dados demosntrados na Tabela 1.

Exposição de <i>P.citricarpa</i> a terpenos voláteis		Nerol	Limoneno	Citronelol		
	8º dia	26,6	-0,57	24,34		
	15º dia	36,66	13,65	40,45		
	22º dia	45,36	-4,07	50,1		
	30º dia	32,82	3,13	53,38		
		Nerol	Limoneno	Citronelol		
	8º dia	80,94	-21,97	83,74		
	15º dia	85,91	-23,15	89,48		
	22º dia	89,59	-4,36	92,44		
	30º dia	84,4	2,69	90,02		
		Nerol	Limoneno	Citronelol	Cariofileno	
	7º dia	24,09	20,35	44,34	-27,64	
	14º dia	34,38	37,96	56,72	-22,51	
	21º dia	26,14	24,67	54,33	-18,97	
		Nerol	Cariofileno	Citronelol	Limoneno	Linalol
	7º dia	36	-62,3	40,52	16	53,47
	14º dia	30,73	-32,7	16,93	15,95	46,07
	21º dia	23,93	-19,18	22,19	13,03	48,17
Suplementação do meio de cultura com terpenos cítricos		Laranja doce	Laranja Transgênica			
	7º dia	-40,63	12,55			
	14º dia	-113,15	4,96			
	21º dia	-120,7	8,74			

TABELA 2 - VALORES INDICANDO % DE INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *P.citricarpa*.

NOTA: valores entre 0 e 100 indicam que ocorreu inibição. Valores menores que zero (negativos) indicam crescimento da *P.citricarpa*, ou seja, houve crescimento do fitopatógeno.

O experimento inicial (GRÁFICO 1 e FIGURA 1) foi realizado duas vezes para a avaliação da influência dos terpenos no crescimento de *P.citricarpa* mostrou que o tratamento com limoneno teve 4% a mais de crescimento, comparando-se com o controle. Já o citronelol e o nerol apresentaram crescimento de aproximadamente 50% menor que o controle (valores referentes ao 22º dia de crescimento).

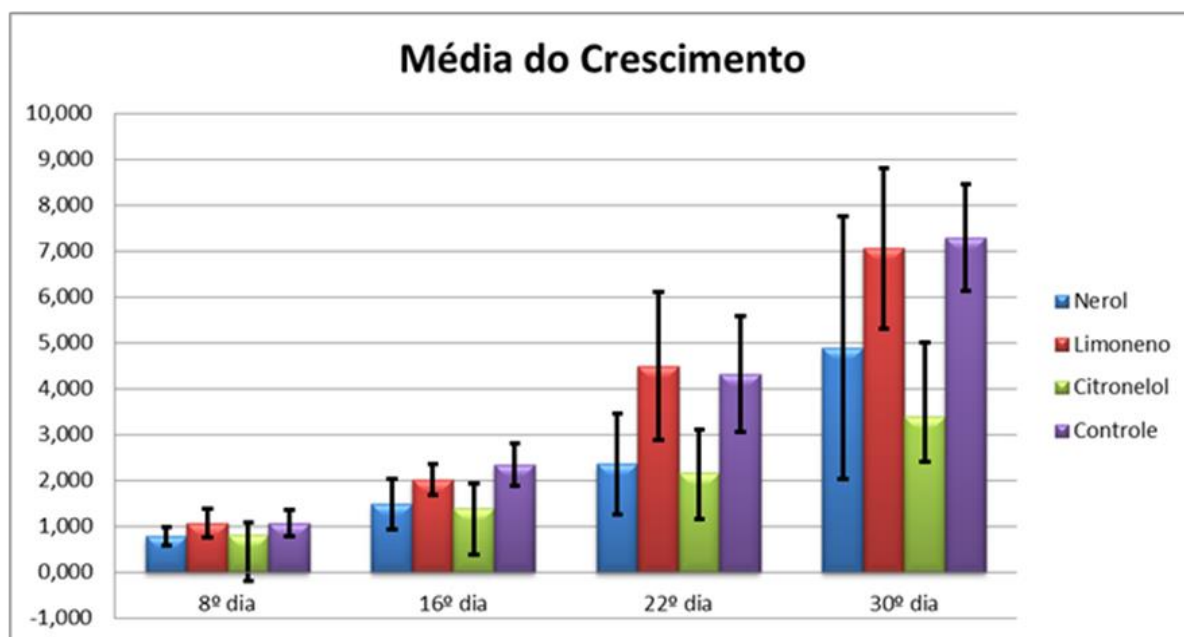


GRÁFICO 1 – MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO DE *P.citricarpa* A TERPENOS VOLÁTEIS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA SOBRE O CRESCIMENTO FUNGICO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foram utilizados 10 µL de cada terpeno nos tratamentos. O eixo y representa o crescimento em cm²

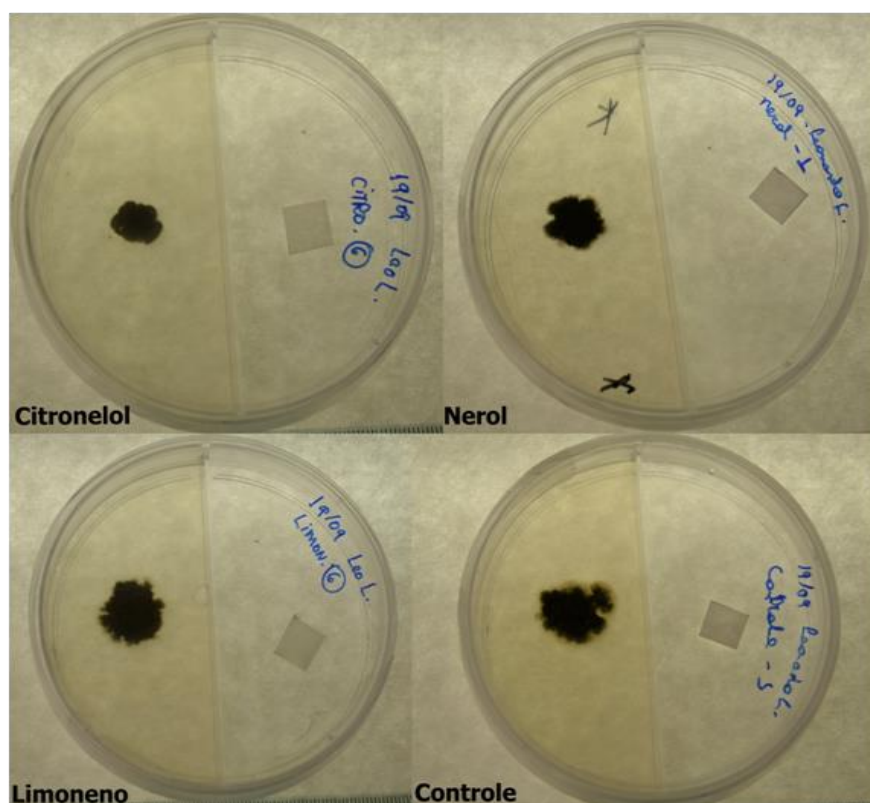


FIGURA 1 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa* COM 16 DIAS DE EXPOSIÇÃO

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 10 µL de cada terpeno nos tratamentos

Neste segundo experimento (GRÁFICO 2) e (FIGURA 2) (mesmas condições do experimento anterior) as análises mostraram crescimento também de 4% maior que o controle em relação ao limoneno, enquanto que nerol e citronelol tiveram crescimento menor em torno de 90% em relação ao controle (valores referentes ao 22º dia de crescimento).

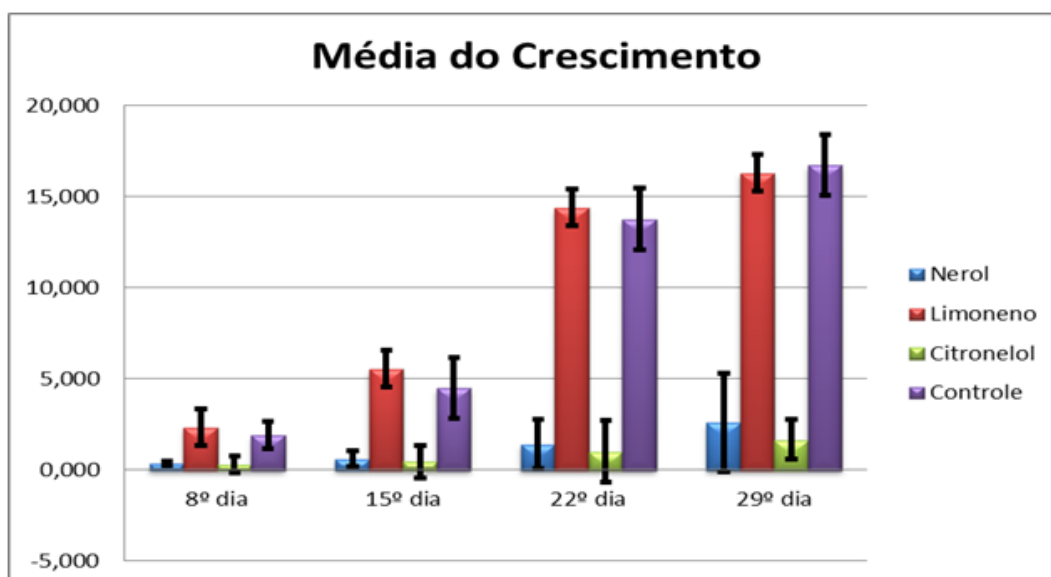


GRÁFICO 2 – MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO DE *P.citricarpa* A TERPENOS VOLÁTEIS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES SOBRE O CRESCIMENTO FUNGICO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 5 µL de cada terpeno nos tratamentos. O eixo Y representa o crescimento em cm²

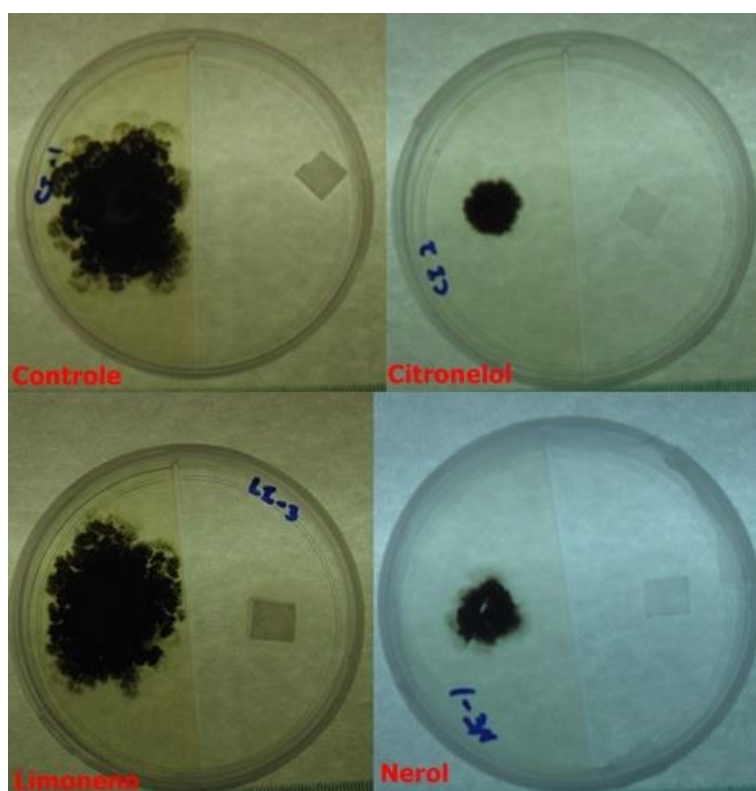


FIGURA 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa* COM 16 DIAS DE EXPOSIÇÃO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 5 μ L de cada terpeno nos tratamentos

O terceiro experimento, que foi realizado utilizando-se vidro de relógio observou-se que o beta-cariofileno apresentou aumento de 20% de crescimento em relação ao controle, todos os outros voláteis tiveram inibição de crescimento, o citronelol 57%, limoneno 26%, linalol 83% e nerol 22% a menos que o controle (GRÁFICO 3) e (FIGURA 3)

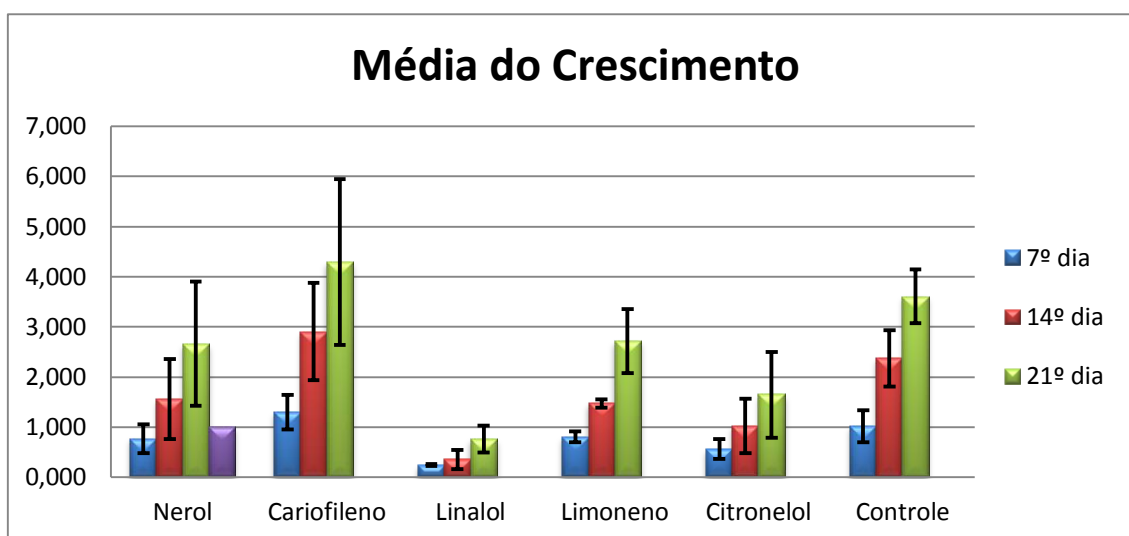


GRÁFICO 3 - MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DA EXPOSIÇÃO DE *P.citricarpa* A TERPENOS VOLÁTEIS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DESTES SOBRE O CRESCIMENTO FUNGICO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 5 μ L de cada terpeno nos tratamentos. O eixo Y representa o crescimento em cm^2

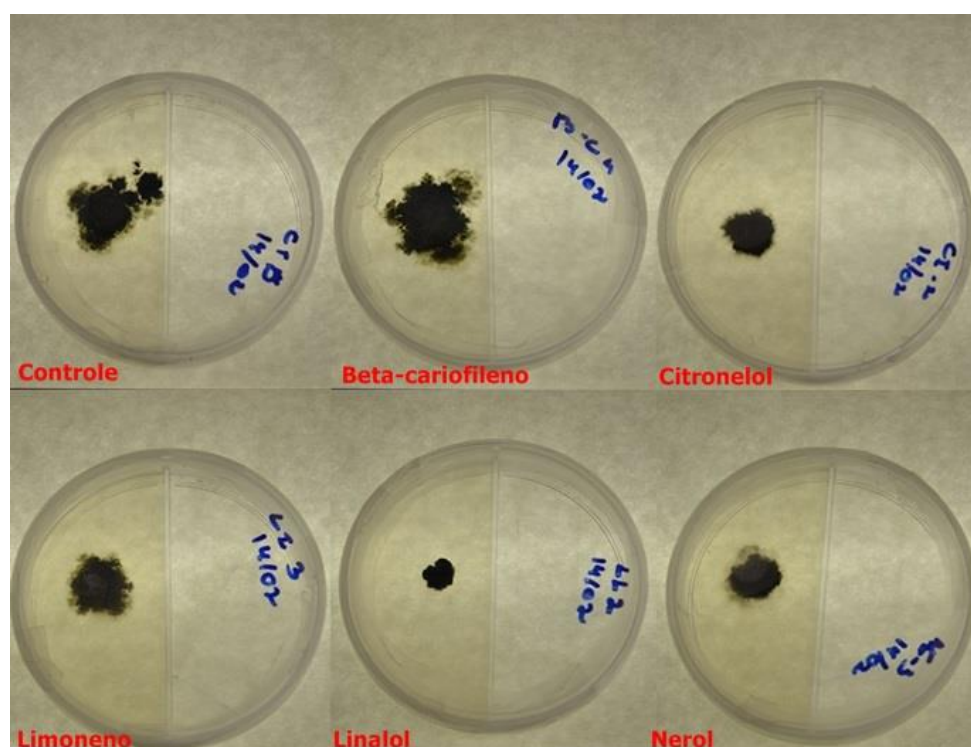


FIGURA 3 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa* COM 21 DIAS DE CRESCIMENTO

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 5 μ L de cada terpeno nos tratamentos

Neste experimento com 21 dias de crescimento a *P. citricarpa* cresceu 20% com cariofileno a mais que o controle, enquanto na presença dos outros voláteis houve uma redução de crescimento em relação ao controle de: 24% para o citrônolol, 14% para o limoneno, 51% para o linalol e 25% para o nerol (GRÁFICO 4) e (FIGURA 4)

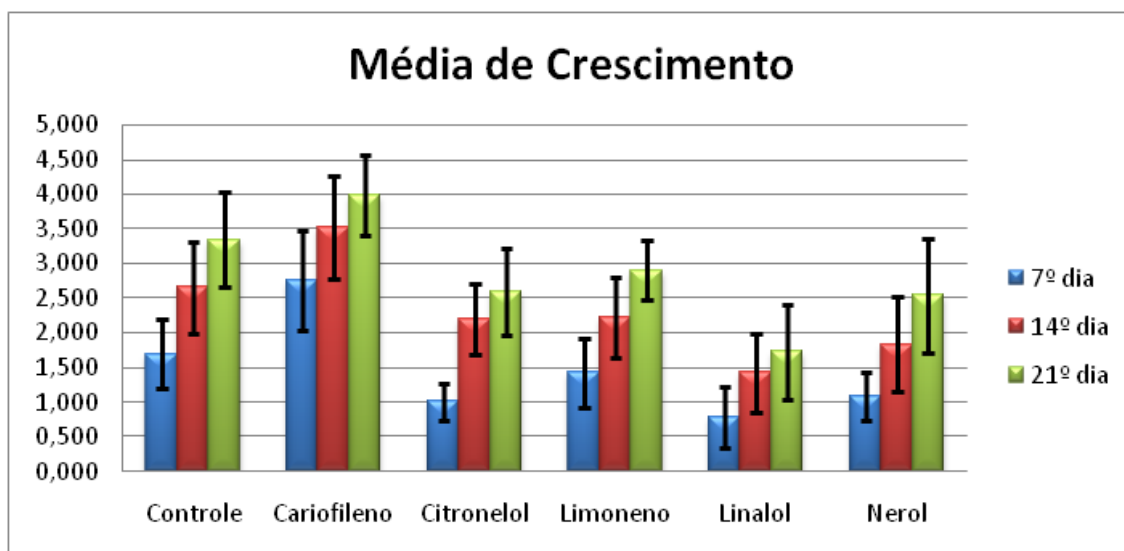


GRÁFICO 4 – MÉDIA DE CRESCIMENTO AO LONGO DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa*.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: foi utilizado 5 µL de cada terpeno nos tratamentos (QUADRO 1). O eixo Y representa o crescimento em cm²

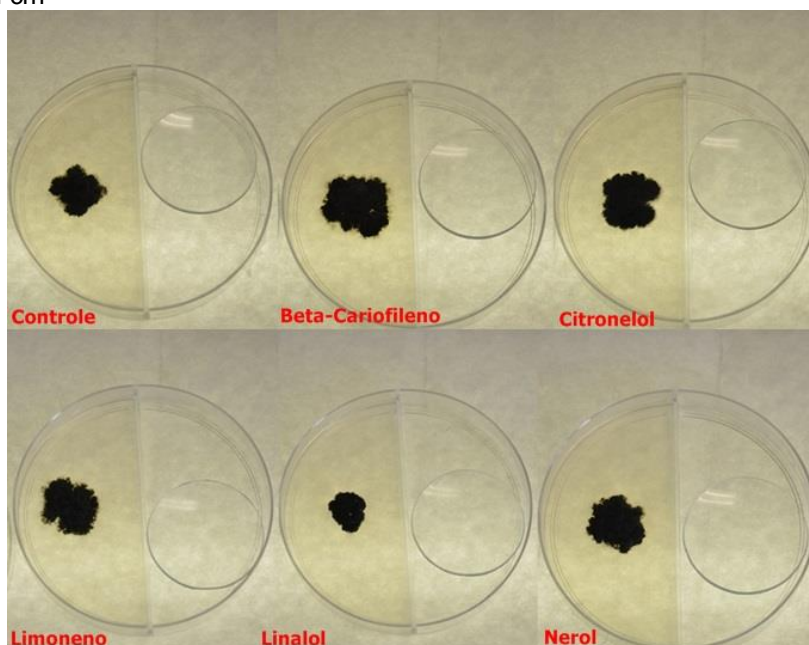


FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NO CRESCIMENTO DE *Phyllosticta citricarpa* COM 21 DIAS DE CRESCIMENTO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: o meio foi utilizado 5 µL de cada terpeno nos tratamentos (QUADRO 1).

A condição testada neste último experimento foi a suplementação do meio de cultura com os todos os terpenos cítricos. Realizando as análises necessárias, com 21 dias de incubação obteve-se os seguintes resultados: placas com cariofileno o fungo cresceu 20% a mais que o controle, enquanto na presença dos outros voláteis ouve uma redução de crescimento em relação ao controle de: 24% para o citronelol, 14% para o limoneno, 51% para o linalol e 25% para o nerol (GRÁFICO 5) e (FIGURA 5).

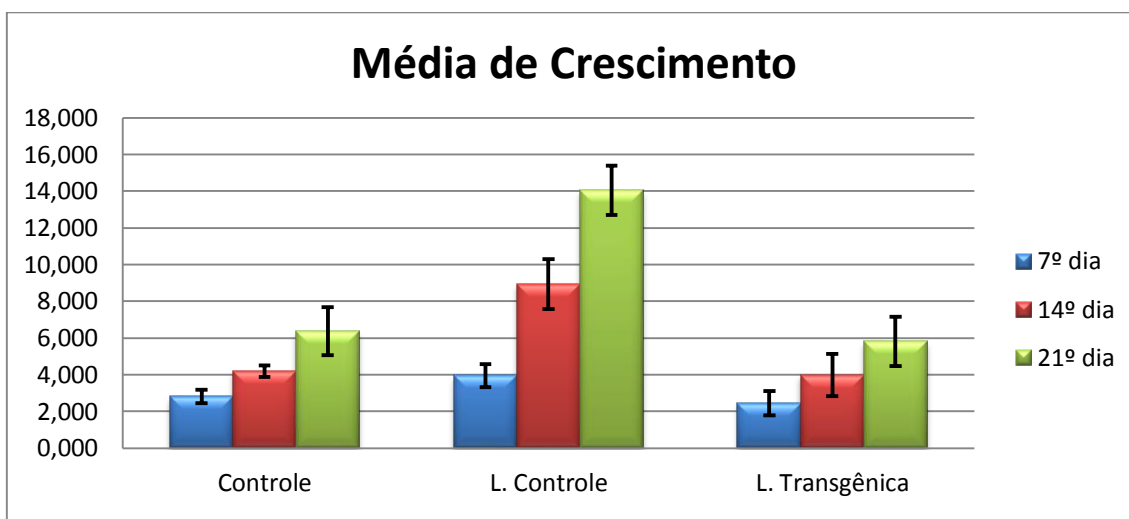


GRÁFICO 5 – MÉDIA DE CRESCIMENTO DE *P.citricarpa*, CRESCIDA EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM TODOS OS TERPENOS CITRICOS JÁ CITADOS PARA A AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE O CRESCIMENTO FÚNGICO.

FONTE: A autora (2013).

NOTA: Concentrações de terpenos utilizadas estão descritas no Quadro 1. O eixo Y representa o crescimento em cm²

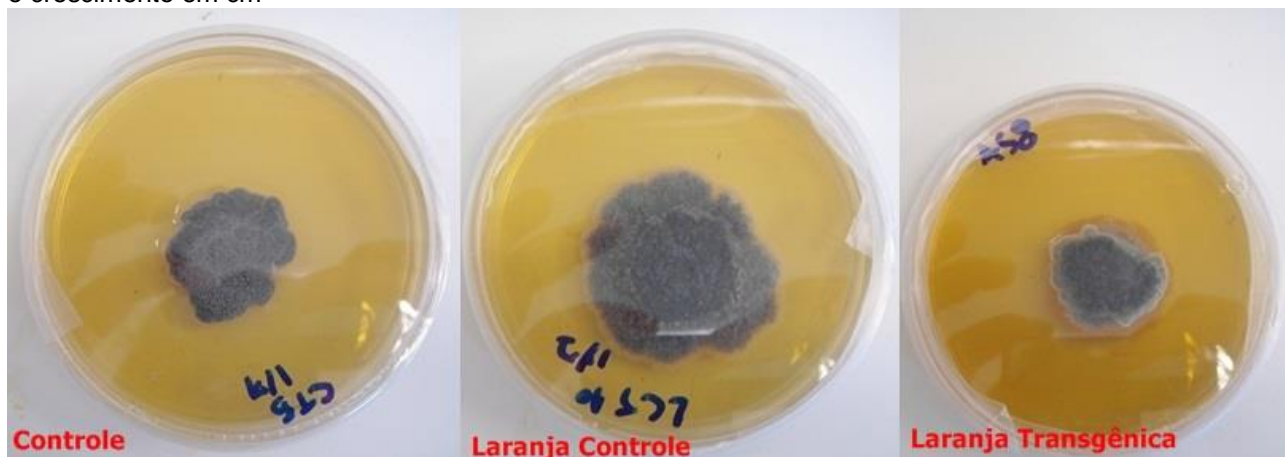


FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *P.citricarpa* EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM TODOS OS TERPENOS CITRICOS JÁ CITADOS COM 21 DIAS DE CRESCIMENTO.

FONTE: A autora (2013).

A média de crescimento de *P. citricarpa* das placas com a concentração da casca da laranja doce foi 225% maior que o crescimento do controle, enquanto as placas com a concentração da casca da laranja transgênica tiveram crescimento de 9% menor que o controle ao longo de 21 dias de duração do experimento 5.

3.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS SOBRE A PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa*

28° dia	Nerol 0%	Citronelol 0%	Limoneno 100%	Controle 70%		
	Nerol	Beta Cariofileno	Citronelol	Limoneno	Linalol	Controle
14º dia	0%	38%	0%	30%	0%	20%
21º dia	0%	100%	20%	70%	10%	60%

TABELA 3 - RESULTADOS OBTIDOS PELOS EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *P.citricarpa*

FONTE: A autora (2014).

NOTA: Os valores foram obtidos pelo programa ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2006)

As análises do 28°C dia de experimento sobre a avaliação da influência dos terpenos na produção de picnídios de *P.citricarpa* mostra que o limoneno induziu a colonização de todas as folhas, enquanto que o controle teve uma taxa de 70% de colonização das folhas (GRÁFICO 6). Com relação ao citronelol e o nerol não foi observado colonização de nenhuma folha como pode ser visto na Figura 6.

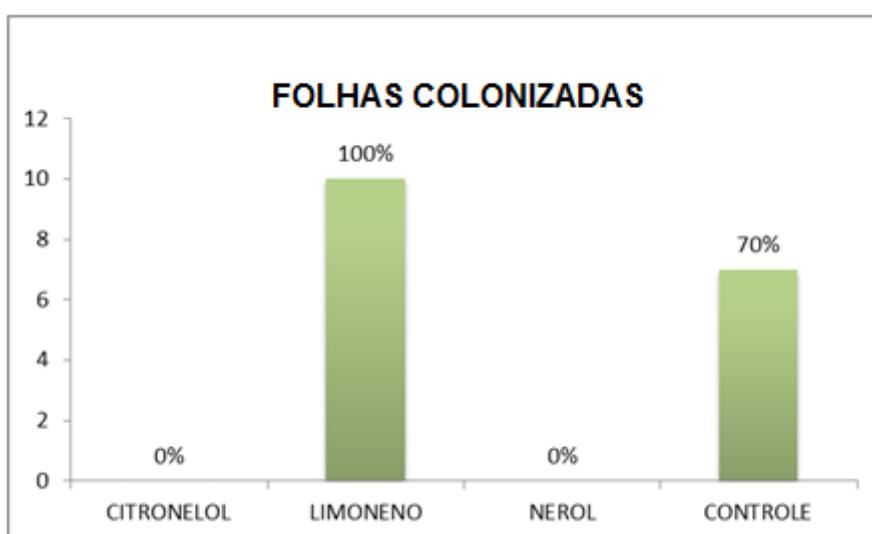


GRÁFICO 6 – DETERMINAÇÃO DA % DE DISCOS DE FOLHAS COLONIZADAS POR *Phyllosticta citricarpa* COM RELAÇÃO AO CONTROLE
 FONTE: A autora (2013).

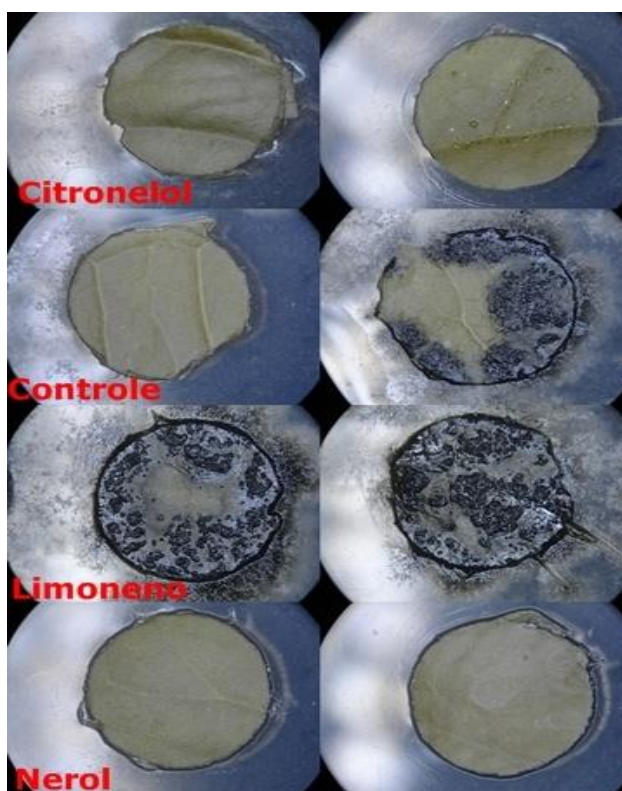


FIGURA 6 – FRAGMENTOS DE FOLHA DO EXPERIMENTO 1 DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* COM 28 DIAS DE INCUBAÇÃO.
 FONTE: A autora (2013).

Nas condições avaliadas neste ultimo experimento, ao 21º dia é possível notar que o beta-cariofileno e o limoneno possui ação estimulatória sobre a produção de picnídios, o limoneno estimulou em 10% a mais a colonização das folhas que o controle. O terpeno beta-cariofileno aumentou a colonização em 40% em relação ao controle. Já os outros voláteis tiveram ação inibitória, que no caso do nerol inibiu totalmente a produção (GRÁFICO 7) (FIGURA 7).

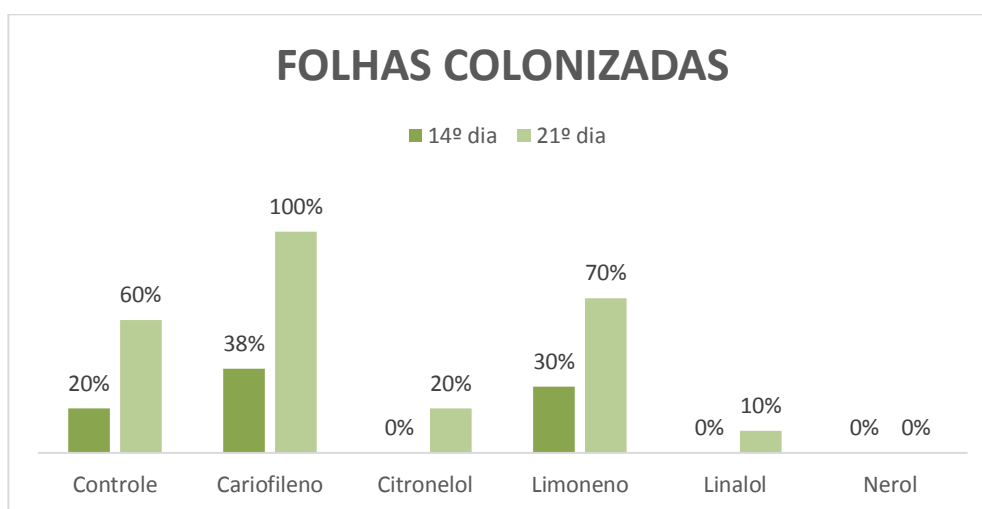


GRÁFICO 7 – DETERMINAÇÃO DA % DE DISCOS DE FOLHAS COLONIZADAS PELA *Phyllosticta citricarpa* COM RELAÇÃO AO CONTROLE EM 14 E 21 DIAS DE INCUBAÇÃO
 FONTE: A autora (2013).

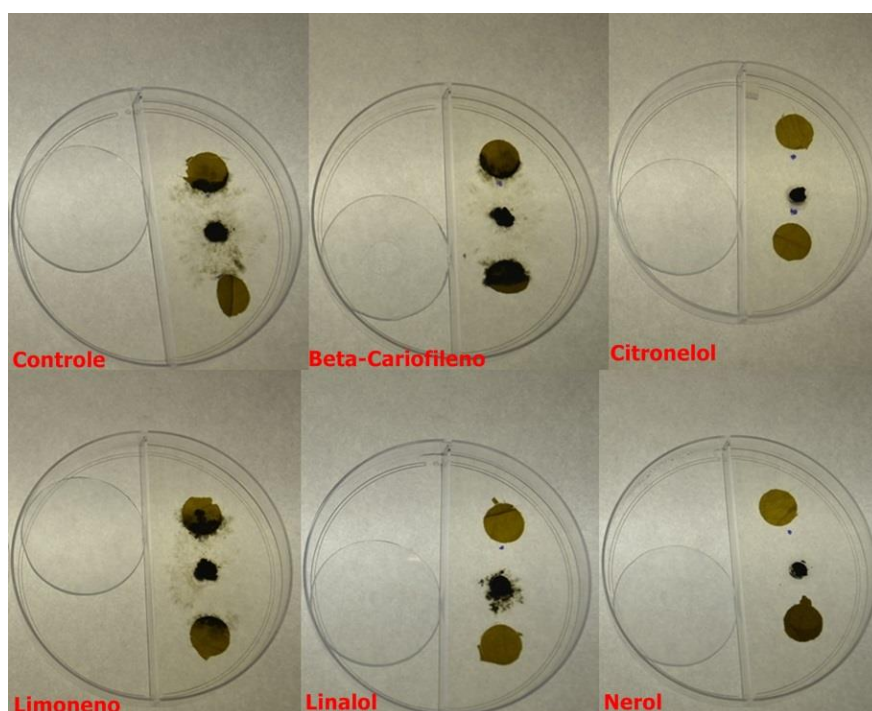


FIGURA 7 – FRAGMENTOS DE FOLHA DO EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TERPENOS NA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DA *Phyllosticta citricarpa* COM 21 DIAS DE INCUBAÇÃO.

FONTE: A autora (2013).

4 DISCUSSÃO

Quando a planta está sob a colonização de um microrganismo, o hospedeiro tem algumas possibilidades de resposta. As próprias moléculas de sinalização do patógeno podem proporcionar um meio pelo qual as plantas podem identificar a ameaça específica e agir. Pires (2012), avaliou a ação de óleos essenciais do gênero *Citrus* em ação contra microrganismos e descreveu a ação antifúngica destes óleos contra *Penicillium expansum*, que tem causado prejuízos na cultura da maçã. É sabido que os metabólitos secundários estão relacionados com a defesa da planta contra patógenos, agem também como atrativos para animais polinizadores e dispersores de semente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Avaliando os resultados dos experimentos foi possível notar a influência dos terpenos no desenvolvimento da *P.citricarpa*. Em todos os experimentos realizados foi possível notar que o citronelol influencia tanto no crescimento da *P. citricarpa* como na influência na produção de picnídios levando a uma taxa

mais baixa nos dois parâmetros avaliados com relação ao controle e também aos outros voláteis. A ação deste terpeno é eficiente, pois a maior colônia encontrada na realização do experimento com citronelol, é menor que a menor colônia observada no controle e no limoneno.

Nos testes com nerol, o fungo apresentou um crescimento menor comparado ao controle e com o limoneno. Já em comparação com o citronelol, foi obtida uma média de crescimento similar, mas com desvio padrão maior. Em relação à produção de picnidiósporos foi possível notar o mesmo tipo de resposta. O linalol também teve essa ação inibitória, sendo ela a maior entre os voláteis testados.

Já o limoneno, ao contrário do citronelol e do nerol, parece apresentar ação estimulatória, pois nas placas onde o fungo cresceu com este volátil foi possível notar um maior crescimento e maior produção de picnídios que o controle. Essa ação estimulatória só é apresentada com uma concentração maior do volátil, visto que nos experimentos utilizando-se 10 µL houve estímulo, enquanto nos experimentos utilizando-se 5 µL houve um menor crescimento, pouco significativo, em relação ao controle. O beta-cariofileno possui ação estimulatória maior que o limoneno.

Em todos os casos, foi utilizado o isolado LGMF006, que foi identificado como possuidor do gene MAT 1-2-1, o mais frequente observado. Considerando a importância da interação entre a planta cítrica e o fitopatógeno em questão, novos estudos deverão ser conduzidos com um isolado MAT 1-1-1, que possui o genótipo menos frequente.

5 CONCLUSÃO

É possível concluir que os terpenos voláteis de citros beta-cariofileno, linalol, limoneno, citronelol e nerol têm influência no crescimento do fungo fitopatogênico *P. citricarpa*, em ensaios *in vitro*.

Considerando que em todos os experimentos realizados o terpeno citronelol influenciou tanto na redução do crescimento da *P. citricarpa* como na produção de picnídios pelo fitopatógeno com relação ao controle e também aos

outros voláteis, um ponto importante para o qual estes dados apontam seria que uma planta com uma super-expressão de citronelol poderia oferecer maior resistência à Mancha Preta dos Citros. Este pode ser mais um passo no entendimento do mecanismo de interação entre planta-patógeno, podendo se tornar uma futura forma de controle dessa patologia.

REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, W. in Limoneno. Disponível em: <http://oleosessenciais.org/category/padroes_tipos/padroes/i_l_padroes/limoneno/> Acessado em setembro de 2013.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus spp.* **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 103-110, 2008.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Eur J Plant Pathol**, 2009.

BASTOS J. F. A.; MOREIRA I. J. A.; RIBEIRO T. P.; MEDEIROS I. A., ANTONIOLLI A. R.; DE SOUSA D. P.; SANTOS, M.R. V. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**, v.106, p. 331 – 337, 2010.

CARNEIRO, F. B.; JÚNIOR, I. D.; LOPES, P. Q.; MACÊDO, R. O. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Rev. bras. Farmacognosia**. Curitiba, v.20, n. 4, 2010.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.100, p.14555-14561, 2003.

CIPOLLINI, ML. Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptive functions. **Revista Chilena De Historia Natural**, v. 73, p.421-440, 2000.

FAHLBUSCH, K.G.; HAMMERSCHMIDT, F.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Flavors and Fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 2003.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial use of essential oils in foods: is citrus the answer? **Trends in Food Science and Technology**, v.19, p.156–164, 2008.

HALL, R.D. Plant metabolomics: from holistics hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Oxford, v.169, p.453-468, 2006

KAVA-CORDEIRO, V.; RODRIGUEZ, A.; VICENT, A.; GLIENKE, C.; PEÑA, L. D-limonene downregulation in transgenic sweet orange provides protection against Citrus Black Spot symptoms induced in detached fruits. In: International Citrus Congress 2012, Valencia, Espanha, 2012.

KRIST, S.; SATO, K.; GLASL, S.; HOEFERL, M.; SAUKEL, S. Antimicrobial effect of vapours of terpineol, (R)-(-)-linalool, carvacrol, (S)-(-)-perillaldehyde and 1, 8-cineole on airborne microbes using a room diffuser. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p.353–356, 2008.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A. Screening of antibacterial of twenty-one oxygenated monoterpenes. Zeitschrift für Naturforschung C-A. **Journal of Biosciences**, v.62, p.507–513, 2007

PIRES, T.C.; PICCOLI, R.H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v.71, n.2, p.259-265, 2012.

RODRIGUES, M.B.C.; SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; PIZZITANI-KLEINER, A.A. Resistência a Benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros. **Pesquisa Agropecuária**, n.3, v.42, p.323-327, 2007.

RODRIGUEZ, A., ANDRÉS, V.S., CERVERA, M., REDONDO, A., ALQUÉZAR, B., SHIMADA, T., GADEA, J., RODRIGO, M.J., ZACARÍAS, L., PALOU, L., LÓPEZ, M.M., CASTAÑERA, P., PEÑA, L. in Terpene Down-Regulation in Orange Reveals the Role of Fruit Aromas in Mediating Interactions with Insect Herbivores and Pathogens. **Plant Physiol**, v.156, 2011.

RODRIGUEZ, A.; ALQUEZAR, B.; PENA, L. Fruit aromas in mature fleshy fruits as signals of readiness for predation and seed dispersal. **New Phytol**, v.197, p.36-48, 2013.

ROSSETTO, M. P.; AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; SCHINOR, E. H. .Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranja doce. **Bragantia [online]**, v.70, n.1, p. 58-63, 2011.

SCHAEFER, H.M. Why fruits go to the dark side, **Acta Oecologica**, v. 37, n.6, p.604-610, 2011

SHARMAN, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiol Res**, p.1-8, 2006.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. DE. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: **Anais**.Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

TAIZ, L.; ZIGER, E. **Fisiologia vegetal**. TRAD. ed E.R. Santarém *et al.* 3.ed Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOBSHY, Z.; SINCLAIR, J.B. Inhibition *in vitro* of *Phomopsis citri* by extracts from orange and by fungicides. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, p.925-927, 1964.

VALIDO, A.; SCHAEFER, H.M.; JORDANO, P. Colour, design and reward: phenotypic integration of fleshy fruit displays. **J. Evol. Biol**, v.24, p.751-760, 2011.

YUAN, W.H.; YI, Y.H.; XUE, M.; ZHANG, H.W.; LA, M.P. Two antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. **Chin J Nat Med**, v.6, p.105–108, 2008

DISCUSSÃO GERAL

O estudo dos genes *mating type* de *P.citricarpa* é de extrema importância para o entendimento do ciclo da Mancha Preta dos Citros, levando em consideração que os ascósporos, responsáveis pela dispersão do fungo por longas distâncias, são produzidos pelo ciclo sexual. Este estudo fornece dados para suportar a hipótese de que *P.citricarpa* é heterotática, necessitando de *mating types* opostos para o desenvolvimento sexual.

Nas diversas condições testadas não foi obtido nenhum esporo sexual, expondo a dificuldade de se obter essas estruturas *in vitro*. Böhm *et al.* (2013) descrevem recentemente a reação sexual de uma espécie muito estudada como o *Penicillium chrysogenum*, mostrando que a obtenção desta reação não é facilitada. Bihon *et al.* (2014) descrevem os genes MAT de *Diplodia pinea*, mas apesar de condições variadas testadas não conseguiram observar corpos de frutificação sexual.

Na tentativa de obtenção de ascósporos, condições de produção e liberação destes esporos foram recriadas em laboratório com o desenvolvimento de caixas com temperatura, ventilação e umidade controlada, utilizando-se plantas axênicas. A caixa tratamento com fragmentos de casca de frutos com lesão não gerou resultados positivos de amplificação pela PCR espécie-específica, o que é corroborado pelo trabalho de Truter *et al.*, (2007) que mostram que frutos caídos no pomar não foram capazes de infectar folhas nos pomares.

Considerando as possibilidades de colonização dos citros por *P.citricarpa* são necessárias outras investigações para um melhor entendimento da interação planta-patógeno. Estudos recentes indicaram que alterações na composição dos óleos voláteis presentes na casca de citros afetam o desenvolvimento do fungo sobre o fruto (KAVA-CORDEIRO *et al.*, 2012), sendo necessária a avaliação individual desses compostos para determinar sua efetividade. Aspectos da colonização dos frutos por *P.citricarpa* foram investigados, avaliando-se a relação entre o crescimento, colonização de folhas e produção de picnícios frente aos principais terpenos produzidos na casca dos frutos cítricos e que

comprovadamente exercem um papel no processo de atração de pragas e patógenos. Foi possível notar a ação estimulatória dos terpenos limoneno e cariofileno com relação ao crescimento e produção de picnídios. Citronelol, linalol e nerol tiveram ação inibitória na produção de picnídios e no crescimento sendo que o linalol apresentou a maior inibição, comparado ao citronelol e nerol. O estudo da resposta deste fitopatógeno a estes terpenos voláteis é importante para elucidar aspectos da interação deste patógeno com seu hospedeiro e poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da Mancha Preta dos Citros.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições testadas e resultados obtidos, o presente estudo permitiu observar que:

- Testes de compatibilidade conduzidos em condições recriadas foram realizados com 165 isolados de *Phyllosticta*. Algumas condições ensaiadas, previamente descritas na literatura, mostraram-se inadequadas para ensaios de compatibilidade entre diferentes isolados de *P. citricarpa*.
- Genes *mating type* foram identificados após o desenho de *primers* específicos para esta espécie.
- Dos 148 isolados investigados, 21,62% apresentaram o gene MAT 1-1-1, 78,38% o gene MAT1-2-1.
- Em todos os testes realizados foi possível detectar que os terpenos cítricos influenciam de diferentes formas o crescimento e a produção de picnídios de *P. citricarpa*.
- Uma planta com uma super-expressão de citronelol poderia oferecer maior resistência à Mancha Preta dos Citros

REFERÊNCIAS

ARZANLOU, M.; CROUS, P. W.; ZWIERS, L.H. Evolutionary Dynamics of Mating-Type Loci of *Mycosphaerella* spp. Occurring on Banana. **Eukaryotic Cell**, v.9, p.164-172, 2010

AZAMBUJA, W. in Limoneno. Disponível em: <http://oleosessenciais.org/category/padroes_tipos/padroes/i_l_padroes/limoneno/> Acessado em setembro de 2013.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C. G.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, p. 464-477, 2002.

BASTOS, R. F. A. *et al.* Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 331–337, 2009.

BELLOTTE, J. A.; KUPPER, K. C.; RINALDO, D.; SOUZA, A.; GOES, A. de. The effects of inter-crop cultivation between rows of citrus crop on spreading of *Guignardia citricarpa* ascospores and in the citrus black spot occurrence. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p.102-111, 2013.

BIHON, W.; WINGFIELD, M.J.; SLIPPERS, B.; DUONG, T.A.; WINGFIELD, B.D. MAT gene idiomorphs suggest a heterothallic sexual cycle in a predominantly asexual and important pine pathogen. *Fungal Genet Biol*, v.62, p.55-61, 2014.

BOUFFARD, K. (2010). *New threat for Florida citrus: black spot*. Acesso em junho de 2010, disponível em <http://www.heraldtribune.com/article/20100407/BREAKING/100409694>

BRIGATI, J.B. **Análise anatômica e molecular do albedo de frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck "Pêra" na interação com *Guignardia citricarpa***. 109f. Dissertação.(mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) . Setor de Ciências. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Curitiba, 2009.

CARNEIRO, F. B.; JÚNIOR, I. D.; LOPES, P. Q.; MACÊDO, R. O. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Rev. bras. Farmacognosia**. Curitiba, v.20, n. 4, 2010.

DALZOTO, P., GLIENKE-BLANCO, C., KAVA-CORDEIRO, V., RIBEIRO, J., KITAJIMA, E., AZEVEDO, J., *et al.* Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, V.110, p.1475-1481, 2006.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J.A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.97, p. 237–249, 2000.

DICKE M.; BALDWIN I.T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends Plant Sci.** v.15, p.167-175, 2010.

FAHLBUSCH, K.G.; HAMMERSCHMIDT, F.; PANTEN, J.; PICKENHAGEN, W.; SCHATKOWSKI, D.; BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Flavors and Fragrances. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 2003.

FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. *Laranja*, v.17, p.79-92, 1996.

GALAGAN, J., CALVO, S.E., CUOMO, C., MA, L.-J., WORTMAN, J., BATZOGLOU, S., LEE, S.-I., BASTU, R.K.MEN, M., SPEVAK, C.C., CLUTTERBUCK, J., *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, p.1105–1115, 2005.

GERSHENZON, J. 2007. Plant volatiles carry both public and private messages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 104:5257–5258.

GLASS, N.L.; VOLLMER, S.J.; STABEN, C.; GROTELUESCHEN, J.; METZENBERG, R.L.; YANOFSKY. DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. **Science** v.241, p.570–573, 1988.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and Pathogenic *Phyllosticta* species with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, v. 26, p. 47-56, 2011.

GOES, A. Controle da Mancha-preta dos frutos cítricos. *Laranja*, v.19, p.305-320, 1998

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R. *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **Mycotaxon**, v. 166, p. 491-500, 2011.

HEITMAN, J.; SUN, S.; JAMES, T.Y. Evolution of fungal sexual reproduction. **Mycologia**, v.105, n.1, p.1-27, 2013.

HISCOCK, S. J.; U. KUES. Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. **International Review Cytology**, v.193, p. 165-295, 1999.

IRMISCH, S.; JIANG, Y.; CHEN, F.; GERSHENZON, J.; TOBIAS G KÖLLNER, T.G. Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*) **BMC Plant Biol.** v.14, n .1, p. 270, 2014.

KAVA-CORDEIRO, V.; RODRIGUEZ, A.; VICENT, A.; GLIENKE, C.; PEÑA, L. D-limonene downregulation in transgenic sweet orange provides protection against Citrus Black Spot symptoms induced in detached fruits. In: International Citrus Congress 2012, Valencia, Espanha, 2012

KOTHE, E. Mating-type genes for classical strain improvement in basidiomycetes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.56, p.589–601, 2001.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981

KRONSTAD, J. (2007). Self-Fertility: The Genetics of Sex in Lonely Fungi. **Current Biology** , v.17, p. R844

LARANJEIRA, F.F.; FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B. Manejo integrado de doenças dos citros. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR, J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.631-652.

LEE SC, N.I.; M., LI W, SHERTZ, C.; HEITMAN, J. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.74, n.2, p. 298-340, 2010.

LIU, J. K.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; WIKKEE, S.; LI, Y.M., *et al.* Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**. v. 57, p. 149–210, 2012.

McONIE, K. C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v. 54, p. 64-67, 1964.

METZENBERG, R.L.; GLASS, N.L.. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. **Bioessays**, v.12, p.53-50, 1990.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: CitrusBR,. 138p. 2011

PAOLETTI, M., SEYMOUR, F.A., ALCOCER, M.J.C., KAUR, N., CALVO, A.M., ARCHER, D.B., AND DYER, P.S. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*. **Current Biology**, v. 17, p.1384–1389, 2007.

RAPPER, J. R. Genetics of sexuality in higher fungi. **Ronald Press**, 1966.

REGO C. AND OLIVEIRA H. 2007. “Black Rot” da videira causado por *Guignardia bidwellii*. Actas do 7º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, 23 a 25 de Maio, Évora, 107-114.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico – CTAA-EMBRAPA**, n. 19, p. 1-5, 1995.

RODRIGUEZ, A., ANDRÉS, V.S., CERVERA, M., REDONDO, A., ALQUÉZAR, B., SHIMADA, T., GADEA, J., RODRIGO, M.J., ZACARÍAS, L., PALOU, L., LÓPEZ, M.M., CASTAÑERA, P., PEÑA, L. in Terpene Down-Regulation in Orange Reveals the Role of Fruit Aromas in Mediating Interactions with Insect Herbivores and Pathogens. **Plant Physiol**, v.156, 2011.

ROSSETTO, M. P.; AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; SCHINOR, E. H. .Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranjeira doce. **Bragantia [online]**, v.70, n.1, p. 58-63, 2011.

SANTOS, M.J.; CORREIA, V.G.; PHILLIPS, A.J.L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology**, v.114, p.255-270, 2010

SCALOPPI, E.M.T. **Mancha preta dos citros: Técnicas de manejo e queda precoce de frutos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal SP, 2010

SHIU, P.K.; GLASS, N.L. Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. **Current Opinion in Microbiology**. v.3, p.183–188, 2000.

SILVA, D. D.; CHIERICE, G. O.; GALHIANE, M. S.; CHARR, J. S.; MOUCHREK-FILHO, V. E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em Cromatografia Gasosa. **Química Nova** vol.26 no.4 São Paulo July/Aug. 2003.

SIVANESAN, A. (1984). The bitunicate Ascomycetes and their anamorphus. J. Cramer , p. 701.

SOUSA, P. F. C. e GOES, A. Reação de laranjeiras-doces quanto à resistência a *Phyllosticta citricarpa*. **Revista Brasileira de Fruticultura** [online], v. 32, p. 718-725, 2010.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 2003. 112p. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo”, Piracicaba.

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; FILHO, A. B.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 57, p. 103-108, 2007.

TURGEON, B.G.; YODER, O. C. Proposed Nomenclature for Mating Type Genes of Filamentous Ascomycetes. **Fungal Genetics and Biologyn**, New York, v.31, p. 1–5, 2000

UNSICKER, S. B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Curr. Opin. Plant Biol**, v.12, p.479–485, 2009.

WIKKE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKOON, R.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaeriales*). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1-29, 2013.

YUN, S. H., M. L. BERBEE, O. C. YODER, AND B. G. TURGEON. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.96, p.5592–5597, 1999.